

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK KASAR DAUN MANGROVE  
MENENGAN (*Excoecaria agallocha*) TERHADAP BAKTERI *Bacillus*  
*cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa***

**SKRIPSI**

Oleh :

**MUHAMMAD RIJAL ABDILLAH  
NIM. 145080307111012**



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK KASAR DAUN MANGROVE  
MENENGAN (*Excoecaria agallocha*) TERHADAP BAKTERI *Bacillus*  
*cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa***

**SKRIPSI**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan  
Di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas Brawijaya**

Oleh :

**MUHAMMAD RIJAL ABDILLAH  
NIM. 145080307111012**



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

SKRIPSI

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK KASAR DAUN MANGROVE  
MENENGAN (*Excoecaria agallocha*) TERHADAP BAKTERI *Bacillus*  
*cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa*

Oleh:  
MUHAMMAD RIJAL ABDILLAH  
NIM. 145080307111012

Telah dipertahankan di depan penguji  
Pada tanggal 28 September 2018  
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Mengetahui  
Ketua Jurusan  
Manajemen Sumberdaya Perairan

Menyetujui,  
Dosen Pembimbing I



Dr. Ir. Muhamad Firdaus, MP

NIP. 19680919 200501 1 001

Tanggal : 12 OCT 2018

Dr. Ir. Bambang Budi Sasmito, MS

NIP. 19570119 198601 1 001

Tanggal : 12 OCT 2018

**LEMBAR KOMISI PENGUJI**

Judul : **UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK KASAR  
DAUN MANGROVE MENENGAN (*Excoecaria  
agallocha*) TERHADAP BAKTERI *Bacillus cereus* dan  
*Pseudomonas aeruginosa***

Nama Mahasiswa : MUHAMMAD RIJAL ABDILLAH

NIM : 145080307111012

Program Studi : TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN

PENGUJI PEMBIMBING:

Pembimbing 1 : Dr. Ir. BAMBANG BUDI SASMITO, MS

PENGUJI BUKAN PEMBIMBING:

Dosen Penguji 1 : Dr. Ir. TITIK DWI SULISTIATI, MP

Dosen Penguji 2 : BAYU KUSUMA S.Pi, M.Sc

Tanggal Ujian : 28 SEPTEMBER 2018

## PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar merupakan hasil karya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, 28 September 2018

Mahasiswa

Muhammad Rijal Abdillah  
NIM. 145080307111012



## UCAPAN TERIMA KASIH

1. Kedua orang tua yang sangat saya banggakan bapak Suwito, dan Ibu Nurjanah, serta adik saya yang sangat saya cintai Melinda dan juga seluruh keluarga besar atas segala doa dan dukungannya.
2. Dr. Ir. Bambang Budi Sasmito, MS selaku Dosen Pembimbing, yang telah banyak memberikan pengarahan serta bimbingan sejak penyusunan usulan penelitian skripsi sampai dengan selesainya skripsi ini.
3. Dosen program studi Teknologi Hasil Perikanan yang telah memberikan ilmu selama kuliah di Fakultas perikanan dan Ilmu Kelautan.
4. Teman-teman tim antibakteri Febrina dan Defri yang sudah membantu saya dalam menyelesaikan skripsi, serta tim bimbingan Pak Bambang (Hesti, Intan, Ali, Irene, dan Rafika) yang telah berjuang bersama.
5. Teman-teman rohingya (Belinda, Anis, Inas, Nita, Ricke, Defri, Aji, Anang, Eki, Yan, Hakim, dan Amar) yang telah memberi saya ruang, masukan, dan dukungan sejak menjadi mahasiswa baru.
6. Teman-teman alumni SMA Muhammadiyah 1 Ponorogo kelas IPA3 regional malang tahun 2014 (Tegar, Pangky, Subuh, Prabowo, Wisnu, Nada, Ega, Hafida, Sherly, dan Niken).
7. Kepada keluarga besar dan tercinta teman-teman program studi Teknologi Hasil Perikanan angkatan 2014.

Malang, 28 September 2018

Penulis



## RINGKASAN

**MUHAMMAD RIJAL ABDILLAH (145080307111012).** Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Daun Mangrove Menengan (*Excoecaria agallocha*) terhadap Bakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* (di bawah bimbingan **Dr. Ir. Bambang Budi Sasmito, MS**)

---

Tumbuhan mangrove sebagai hutan payau atau hutan bakau adalah pohon-pohonan yang tumbuh di daerah payau pada tanah aluvial atau pertemuan air laut dan air tawar di sekitar muara sungai. *Excoecaria agallocha* merupakan jenis mangrove yang banyak dimanfaatkan oleh masyarakat. Daun mangrove *Excoecaria agallocha* memiliki kandungan bioaktif dan berpotensi sebagai antibakteri. Bakteri patogen adalah bakteri yang dapat menimbulkan penyakit pada manusia, diantaranya adalah *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteri *Bacillus cereus* dilaporkan mengontaminasi susu, sedangkan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* kebanyakan terdapat pada bahan pangan yang mampu menyebabkan kerusakan bahan pangan. Penggunaan antibiotik sintesis dapat menyebabkan resistensi bakteri jika digunakan terus-menerus, sehingga perlu alternatif menggunakan antibiotik alami. Berdasarkan uraian di atas, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari daun mangrove menengan terhadap bakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* agar dapat dimanfaatkan dalam kehidupan sehari-hari.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi ekstrak daun mangrove menengan terhadap aktivitas bakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* sebagai antibakteri berdasarkan metode difusi dan dilusi. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Perekayasaan Hasil Perikanan, Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang dan Pusat Laboratorium Forensik POLRI Jakarta Timur pada bulan Maret sampai Mei 2018. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Penelitian ini dilaksanakan dalam dua tahap, yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Penelitian pendahuluan meliputi preparasi, ekstraksi, uji fitokimia, uji kadar air, dan uji toksisitas, sedangkan penelitian utama meliputi uji aktivitas antibakteri berdasarkan metode difusi dan diuji dengan uji LC-MS. Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana. Metode pengujian data yang digunakan adalah analisis sidik ragam (ANOVA), apabila terdapat perbedaan yang nyata maka dilanjutkan dengan uji Tukey.

Hasil penelitian ini didapatkan nilai rendemen tertinggi pada ekstrak pelarut metanol yaitu  $8,24 \pm 0,10$  dan terendah pada pelarut n-heksan  $1,97 \pm 0,10$ , sedangkan pada ekstrak pelarut etil asetat didapatkan nilai rendemen  $2,38 \pm 0,13$ . Pada uji kadar air didapatkan nilai tertinggi pada pelarut etil asetat yaitu  $18,83 \pm 1,47$ , dan terendah pada pelarut metanol  $7,67 \pm 0,52$  sedangkan pada pelarut n-heksan nilai kadar air sebesar  $13,83 \pm 1,17$ . Pada uji fitokimia pada pelarut n-heksan mengandung senyawa steroid, pada pelarut etil asetat mengandung flavonoid dan steroid, pada pelarut metanol mengandung flavonoid, tanin, triterpenoid, dan saponin. Pada uji toksisitas didapatkan nilai LC50 tertinggi yaitu pada pelarut n-heksan dengan nilai  $3869,33 \pm 301,62$  ppm dan terendah pada pelarut metanol dengan nilai  $825,09 \pm 72,98$  ppm, sedangkan pada pelarut etil asetat nilai LC50 sebesar  $1583,41 \pm 109,39$  ppm. Pada uji daya hambat didapatkan hasil daya zona hambat tertinggi pada bakteri *Bacillus cereus*

adalah konsentrasi ekstrak kasar *Excoecaria agallocha* dengan nilai  $18,09 \pm 0,43$  mm dan pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* tertinggi adalah dengan nilai  $15,09 \pm 0,38$ .

Ekstrak kasar daun *Excoecaria agallocha* mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus* sebesar 10,70 mm pada konsentrasi 0,58 g/ml dan mampu membunuh *Bacillus cereus* sebesar 10,70 mm pada konsentrasi 2,30 g/ml. Pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* mampu menghambat sebesar 8,43 mm pada konsentrasi 0,64 g/ml dan membunuh sebesar 8,43 mm pada konsentrasi 2,57 g/ml. Hasil Uji LCMS teridentifikasi mengandung senyawa *Epicatechin*, *Coumarin*, *Rhamnazin*, dan *Benzoic acid*





## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur selalu tercurahkan kepada Allah SWT, Tuhan semesta alam, yang telah melimpahkan segala rahmat serta karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Daun Mangrove Menengan (*Excoecaria agallocha*) terhadap Bakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa*”. Laporan skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat memperoleh gelar sarjana perikanan dari Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Laporan skripsi ini berisikan tentang penelitian yang memanfaatkan daun menengan sebagai bahan antibakteri terhadap bakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Oleh karena bakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri patogen yang dapat menyebabkan gangguan kesehatan khususnya pada sistem pencernaan, maka diharapkan ekstrak kasar daun mangrove menengan tersebut dapat menjadi alternatif pengobatannya.

Penulis sadar bahwa laporan skripsi ini masih banyak kekurangan. Oleh karena itu, segala kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi perbaikan atas berbagai kekurangan dalam laporan skripsi ini. Semoga laporan skripsi ini berguna bagi para pembaca dan dapat menjadi acuan untuk penelitian selanjutnya.

Malang, 28 September 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
USULAN SKRIPSI.....	iii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
RINGKASAN .....	vi
KATA PENGANTAR .....	viii
PERNYATAAN ORISINALITAS .....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiv
 1. PENDAHULUAN.....	 1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	3
1.3. Tujuan .....	4
1.4. Hipotesis.....	4
1.5. Manfaat.....	5
1.6. Waktu dan tempat.....	5
 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	 6
2.1. Klasifikasi dan morfologi <i>Elexcoecaria agallocha</i> .....	6
2.2. Komponen Bioaktif <i>Elexcoecaria agallocha</i> .....	7
2.3. Bakteri <i>Bacillus cereus</i> .....	9
2.4. Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	10
2.5. Ekstraksi Sampel .....	11
2.6. Identifikasi Fitokimia.....	12
2.7. Pengujian Toksisitas.....	13
2.8. Aktivitas Antibakteri .....	14
2.8.1. Metode Difusi .....	15
2.8.2. Metode Dilusi.....	16
2.9. LC-MS (Liquid Chromatograph Mass Spectrofotometry) .....	17
 3. METODE PENELITIAN.....	 19
3.1. Materi Penelitian .....	19
3.1.1. Bahan Penelitian .....	19
3.1.2. Alat Penelitian .....	19
3.2. Metode Penelitian .....	20
3.2.1. Metode .....	20
3.2.2. Variabel.....	20
3.2.3. Parameter Uji .....	21

3.2.4.	Rancangan penelitian.....	21
3.3.	Prosedur penelitian.....	23
3.3.1.	Preparasi Bahan Baku (Modifikasi Prihanto et al., 2011).....	23
3.3.2.	Ekstraksi Daun <i>Excoecaria agallocha</i> .....	24
3.3.3.	Perhitungan Rendemen (Yulia, 2007).....	27
3.3.4.	Uji Kadar Air.....	27
3.3.5.	Uji Fitokimia.....	28
3.3.6.	Uji Toksisitas (Brine Shrimp Lethal Test).....	33
3.3.7.	Uji aktivitas Antibakteri (Metode Difusi Agar).....	35
3.3.8.	Metode Dilusi MIC ( <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> ) dan MBC ( <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> ).....	37
3.3.9.	Analisis Liquid Chromatograph Mass Spectrofotometry.....	37
3.4.	Analisis data.....	38
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	40
4.1.	Rendemen Ekstrak Kasar Daun Mangrove <i>Excoecaria agallocha</i> ....	40
4.2.	Kadar Air Ekstrak Kasar Daun Mangrove <i>Excoecaria agallocha</i> .....	41
4.3.	Fitokimia Ekstrak Kasar Daun Mangrove <i>Excoecaria agallocha</i> .....	43
4.4.	Toksisitas Ekstrak Kasar Daun Mangrove <i>Excoecaria agallocha</i> .....	45
4.5.	Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Daun Mangrove <i>Excoecaria agallocha</i> .....	48
4.6.	Identifikasi Senyawa Bioaktif dengan Uji <i>Liquid Chromatograph Mass Spectrometry</i> (LC-MS).....	53
5.	PENUTUP.....	58
5.1.	Kesimpulan.....	58
5.2.	Saran.....	58
	DAFTAR PUSTAKA.....	59

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komponen Bioaktif Daun Menengan.....	8
2. Rancangan Percobaan Penelitian Pendahuluan .....	22
3. Rancangan Percobaan Penelitian Utama .....	22
4. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Kasar Daun <i>Excoecaria agallocha</i> .....	42
5. Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Kasar Daun <i>Excoecaria agallocha</i> terhadap Bakteri <i>Bacillus cereus</i> .....	48
6. Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Kasar Daun <i>Excoecaria agallocha</i> terhadap Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	49
7. Klasifikasi Kekuatan Senyawa Antibakteri.....	49
8. Hasil penentuan MIC dan MBC Ekstrak Daun Mangrove Menengan <i>Excoecaria Agallocha</i> terhadap bakteri <i>Bacillus cereus</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	52
9. Senyawa Pada Ekstrak Metanol Daun <i>Excoecaria agallocha</i> .....	56



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Mangrove Menengan ( <i>Excoecaria agallocha</i> ) .....	7
2. Bakteri <i>Bacillus cereus</i> .....	10
3. Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	11
4. Prosedur Preparasi Bahan Baku .....	24
5. Skema Ekstraksi Daun menengan .....	26
6. Skema Pengujian Kadar Air .....	28
7. Skema Pengujian Alkaloid .....	29
8. Skema Pengujian Flavonoid .....	30
9. Skema Pengujian Steroid dan Terpenoid .....	31
10. Skema Pengujian Saponin .....	32
11. Skema Pengujian Tanin .....	33
12. Skema Penyiapan Larva <i>Artemia salina</i> Lench .....	33
13. Skema Uji Toksisitas Ekstrak Daun <i>Excoecaria agallocha</i> .....	35
14. Skema Uji Aktivitas Antibakteri .....	36
15. Skema Pengujian LC-MS .....	38
16. Hasil Rendemen Ekstrak Kasar Daun Menengan .....	40
17. Hasil Kadar Air Ekstrak Kasar daun menengan .....	42
18. Hasil Toksisitas Ekstrak Kasar daun menengan .....	46
19. Zona Bening pada Bakteri <i>Bacillus cereus</i> dan Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	49
20. Diameter Zona Hambat Ekstrak Kasar Daun Menengan Terhadap Bakteri <i>Bacillus cereus</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	50
21. Kromatogram Daun <i>Excoecaria agallocha</i> .....	54
22. Spektrum Massa Waktu Retensi 0,99 .....	54
23. Spektrum Massa Waktu Retensi 6,44 .....	55
24. Spektrum Massa Waktu Retensi 8,09 .....	55
25. Spektrum Massa Waktu Retensi 14.12 .....	55

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Data Hasil Perhitungan dan ANOVA Rendemen.....	67
2. Data Hasil Perhitungan dan ANOVA Rendemen.....	69
3. Perhitungan Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji Toksisitas .....	71
4. Data Hasil Perhitungan dan ANOVA Uji Toksisitas .....	73
5. Perhitungan Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji Antibakteri .....	84
6. Data Hasil Perhitungan dan ANOVA Uji Aktivitas Antibakteri .....	87
7. Data Hasil Uji MIC MBC.....	89
8. Dokumentasi Penelitian .....	91
9. Pengujian LCMS.....	94



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Tumbuhan mangrove sebagai hutan payau atau hutan bakau adalah pohon-pohonan yang tumbuh di daerah payau pada tanah aluvial atau pertemuan air laut dan air tawar di sekitar muara sungai. Tumbuhan di hutan mangrove bersifat unik karena merupakan gabungan dari ciri-ciri tumbuhan yang hidup di darat dan di laut (Prastomo *et al.*, 2017).

Menurut Deppa dan Padjama (2014), *Excoecaria agallocha* L. (Famili Euphorbiaceae) adalah tanaman yang memiliki daun berwarna hijau. Tanaman mangrove yang biasa ditemukan di daerah pesisir muara. Mereka adalah salah satu spesies yang banyak terlihat di hutan Pichavaram. Umumnya dikenal sebagai "pohon buta" *Excoecaria agallocha* L. biasanya digunakan sebagai obat tradisional untuk menyembuhkan berbagai macam penyakit.

*Excoecaria agallocha* adalah tanaman mangrove yang dapat tumbuh baik di beberapa negara Asia yang beriklim tropis. Tanaman sambung darah umumnya ditanam di pekarangan rumah sebagai pagar hidup atau tanaman hias. Ekstrak tumbuhan sambung darah atau yang disebut juga sebaga *Excoecaria agallocha* memiliki potensi besar sebagai antimikroba dan dapat digunakan untuk mengobati penyakit menular yang disebabkan oleh mikroorganisme yang telah resisten (Poeloengan dan Andriadi, 2013). *Excoecaria agallocha* merupakan salah satu vegetasi mangrove yang diketahui mempunyai aktivitas antioksidan, antikanker, anti jamur dan antimikroba (Prihanto *et al.*, 2011).

Pencarian bahan antibakteri baru dapat dilakukan dengan pendekatan eksploratif yaitu dengan pengembangan bahan alam. Pemenuhan kebutuhan obat baru yang dilakukan melalui kerja eksploratif ditujukan untuk pencarian variasi struktur senyawa obat yang secara klinis masih digunakan dengan



memanfaatkan sumber daya alam. Sumber daya alam yang telah dimanfaatkan sebagai sumber bahan obat diantaranya adalah mangrove dari jenis *E. Agallocha* (Puspitasari, 2017).

Antibakteri menurut Sartika *et al.* (2013), merupakan zat yang berfungsi membunuh atau menekan pertumbuhan dan reproduksi bakterinya. Berdasarkan aktivitas zat antibakteri dapat bersifat bakterisidal (membunuh bakteri), bakteriostatik (menghambat pertumbuhan bakteri) atau menghambat germinasi spora bakteri. Senyawa antibakteri yang mempunyai daya penghambatan terhadap banyak jenis mikroorganisme baik kokus, basil, maupun spiral disebut senyawa antimikroba yang mempunyai spektrum luas (Puspitasari, 2017).

Bakteri patogen adalah bakteri yang mampu menyebabkan penyakit. Bakteri patogen dapat menyebar melalui populasi manusia dalam berbagai cara. Pengobatan infeksi yang disebabkan bakteri patogen melibatkan penggunaan antibiotik, obat yang telah diformulasikan khusus untuk membunuh bakteri. Bakteri patogen menurut Khotimah dan Kusnadi, (2014) dapat menyebabkan bahaya karena memiliki kemampuan menginfeksi, menimbulkan penyakit dan merusak kualitas bahan pangan. Salah satu bakteri patogen diantaranya yaitu *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Menurut Siregar *et al.* (2012,) *Pseudomonas aeruginosa* merupakan kuman patogen yang sering menyebabkan infeksi kulit pada manusia. *Pseudomonas aeruginosa* adalah jenis bakteri yang tidak mati oleh perlakuan desinfektan. Bakteri ini banyak terdapat pada daerah tanah yang basah. Bakteri ini menghasilkan pigment hijau yang berbau seperti pisang masak, dan disebut pyosianin. Bakteri ini sering mencemari luka bakar, dan tetap hidup dengan pemberian desinfektan, karena bahan organik yang ada pada desinfektan digunakan sebagai sumber karbon (Haribi dan yusro, 2010).

Menurut Mailia *et al.* (2015), *Bacillus cereus* dapat ditemukan pada berbagai jenis pangan, seperti beras, kentang dan pasta, daging dan hasil

lahannya, susu dan hasil olahan susu, biji-bijian, bumbu, sayuran dan juga pada kacang-kacangan kering. *Bacillus cereus* merupakan bakteri jenis gram positif. Bakteri ini sering dikaitkan terutama dengan keracunan makanan, beberapa dilaporkan sebagai penyebab infeksi non gastrointestinal yang serius dan berpotensi fatal (Yulineri dan Nurhidayat, 2015).

Berdasarkan uraian di atas, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari daun mangrove menengan *Excoecaria agallocha* serta menentukan konsentrasi optimalnya terhadap bakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa*, sehingga dapat memberikan manfaat dan informasi keilmuan kepada masyarakat maupun akademisi.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan penjabaran latar belakang di atas, dapat dirumuskan pernyataan :

1. Bagaimanakah pengaruh tingkat konsentrasi ekstrak kasar daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*) terhadap aktivitas antibakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa*?
2. Berapa konsentrasi ekstrak kasar daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*) yang menghasilkan zona hambat tertinggi pada bakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan menggunakan metode difusi?
3. Berapa konsentrasi minimum ekstrak kasar daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*) yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) dan membunuh bakteri (bakterisidal) *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan metode dilusi?

### 1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh konsentrasi ekstrak kasar daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*) terhadap aktivitas antibakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Menentukan konsentrasi ekstrak kasar daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*) yang menghasilkan zona hambat tertinggi pada bakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan menggunakan metode difusi.
3. Menentukan konsentrasi minimum ekstrak kasar daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*) yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) dan membunuh bakteri (bakterisidal) *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan metode difusi.

### 1.4 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah :

1. Perbedaan tingkat konsentrasi ekstrak kasar daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*) memberikan pengaruh terhadap aktivitas antibakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Konsentrasi ekstrak kasar daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*) yang tertinggi menghasilkan zona hambat tertinggi pada bakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* berdasarkan metode difusi.
3. Konsentrasi minimum ekstrak kasar daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*) mampu menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) dan membunuh bakteri (bakterisidal) *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan metode difusi.

### 1.5 Manfaat

- Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai informasi ilmiah mengenai bahan aktif yang terdapat pada daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*).
- Menambah data ilmiah dari daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*).
- Sebagai studi lebih lanjut mengenai penggalian informasi bahan.
- Antibakteri di alam terutama pada tumbuhan lokal pesisir.

### 1.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Perekayasaan Hasil Perikanan, Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang dan Pusat Laboratorium Forensik POLRI Jakarta Timur pada bulan Maret sampai Mei 2018.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Klasifikasi dan Morfologi *Excoecaria agallocha*

*Excoecaria agallocha* juga bisa disebut sebagai menengan. Tanaman ini tumbuh pada bagian pinggir mangrove di bagian daratan, mempunyai kulit batang berwarna abu-abu atau kecoklatan dan terdapat bintil-bintil berwarna coklat keputihan. Klasifikasi mangrove *Excoecaria agallocha* menurut Kaliamurthi *et al.* (2014), digolongkan sebagai berikut :



Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Ordo	: <i>Euphorbiales</i>
Famili	: <i>Euphorbiaceae</i>
Genus	: <i>Excoecaria</i>
Spesies	: <i>Excoecaria agallocha</i>

*Excoecaria agallocha* L. (Euphorbiaceae) atau dikenal dengan sebutan bakau susu, tumbuh di tanah yang berpasir atau di lumpur kering di pinggiran terrestrial tumbuh-tumbuhan mangrove. Jenis mangrove ini tersebar secara luas dari Afrika Timur sampai Samoa (Zhang *et al.*, 2008). Mangrove *Excoecaria agallocha* memiliki ciri-ciri yaitu tinggi pohon biasanya sampai 15 meter dengan getah yang melimpah (Kaliamurthi dan Selvaraj, 2016). Memiliki batang pohon yang keras berwarna abu-abu, daun berbentuk meruncing, memiliki bunga yang sangat kecil serta memiliki buah yang kecil-kecil dan bergerombol (Hossain *et al.*, 2009). *Excoecaria agallocha* dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1. *Excoecaria agallocha* (Dokumen pribadi, 2017)**

Menurut penelitian Chen dan Ye (2014), menyatakan bahwa tanaman yang dikenal dengan sebutan bakau susu ini merupakan tanaman obat yang sangat penting diantara beberapa mangrove lain di daerah China bagian Tenggara. Suku India menggunakan asap dari pembakaran kulit batang sebagai obat untuk menyembuhkan lepra (Satyan *et al.*, 2009). Getah mangrove ini telah diketahui dapat menyebabkan iritasi pada kulit, dan jika terkena mata maka akan menyebabkan kebutaan sementara, sehingga tanaman ini dikenal dengan tanaman buta-buta. Selain itu getah nya juga dapat digunakan sebagai racun ikan dan racun pada panah (Laith dan Najiah, 2014).

## **2.2 Komponen Bioaktif *Excoecaria agallocha***

Senyawa bioaktif merupakan senyawa yang terkandung dalam tubuh hewan maupun tumbuhan yang memiliki berbagai manfaat bagi kehidupan manusia, diantaranya sebagai sumber antioksidan, antibakteri, antiinflamasi, dan antikanker (Firdiyani *et al.*, 2015). Komponen bioaktif yang terdapat pada kulit daun *Excoecaria agallocha* dapat dilihat pada Tabel 1.



**Tabel 1. Komponen Bioaktif Daun Menengan**

Senyawa	Hasil
Alkaloid	Positif
Steroid	Negatif
Flavonoid	Negatif
Tanin	Positif
Terpenoid	Positif
Saponin	Negatif

Sumber: Prihanto *et al.*, 2011

- **Alkaloid**

Alkaloid menurut Ningrum *et al.* (2016), adalah senyawa metabolit sekunder terbanyak yang memiliki atom nitrogen, yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan dan hewan. Sebagian besar senyawa alkaloid bersumber dari tumbuh-tumbuhan, terutama angiosperm. Lebih dari 20% spesies angiosperm mengandung alkaloid. Alkaloid dapat ditemukan pada berbagai bagian tanaman, seperti bunga, biji, daun, ranting, akar dan kulit batang. Alkaloid mempunyai efek dalam bidang kesehatan berupa pemicu sistem saraf, menaikkan tekanan darah, mengurangi rasa sakit, antimikroba, obat penenang, obat penyakit jantung dan lain-lain (Aksara *et al.*, 2013).

- **Tanin**

Tanin merupakan suatu senyawa polifenol yang memiliki berat molekul besar yang terdiri dari gugus hidroksi dan karboksil. Senyawa tanin terdiri dari dua jenis yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis (Sari *et al.*, 2015). Tanin merupakan senyawa aktif metabolit sekunder yang diketahui mempunyai beberapa khasiat diantaranya yaitu sebagai *astringent*, anti diare, antibakteri dan antioksidan. Tanin berbentuk serpihan mengkilat berwarna kekuningan sampai coklat muda atau serbuk amorf, tidak berbau, atau sedikit berbau khas. Tanin biasanya disebut juga asam tanat atau galotanat. Tanin memiliki sifat kelarutan sangat mudah larut dalam air, larut alkohol, larut aseton, larut 1:1 dalam gliserol hangat, praktis tidak larut dalam petroleum,



kloroform dan eter (Amelia, 2015). Menurut Fajrina, (2016) tanin ini berperan dalam pengurangan daya serap zat besi (Fe). Selain itu, tanin diketahui dapat berikatan dengan protein dan mineral sehingga protein dan mineral tidak dapat digunakan oleh tubuh.

- **Terpenoid**

Menurut Gunawan, (2008) senyawa terpenoid memiliki aktivitas sebagai antibakteri yaitu monoterpenoid linalool, diterpenoid (-) hardwicklic acid, phytol, triterpenoid saponin dan triterpenoid glikosida. terpenoid juga mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, penghambat sel kanker, inhibisi terhadap sintesis kolesterol, antiinflamasi, gangguan menstruasi, patukan ular, gangguan kulit, kerusakan hati, dan malaria (Astuti *et al.*, 2017)

### 2.3 **Bakteri *Bacillus cereus***

*Bacillus cereus* ialah bakteri berbentuk batang yang berspora dan bersifat gram positif, selnya berukuran besar dibandingkan dengan bakteri batang lainnya serta tumbuh secara *aerob* fakultatif. Untuk membedakan *Bacillus cereus* dengan *Bacillus* lainnya digunakan ciri morfologi dan biokimia. *Bacillus cereus* merupakan salah satu jenis bakteri yang masuk ke dalam genus *Bacillus* yang banyak ditemukan pada makanan dan dapat menyebabkan sakit pada manusia sehingga digolongkan ke dalam bakteri patogen. Bakteri ini mampu menghasilkan spora yang tahan terhadap panas dan proses dehidrasi. (Amanati, 2014). Klasifikasi *Bacillus cereus* menurut Todar (2012), adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacilliales
Family	: Bacillaceae

Spesies : *Bacillus cereus*



Gambar 2. *Bacillus cereus* (Todar, 2012)

Sel *Bacillus cereus* menurut Yulineri dan Nurhidayat, (2015) mempunyai ujung yang berbentuk empat persegi dan tersusun dalam rantai panjang. Spora biasanya terletak di tengah basil yang tidak bergerak dan resisten terhadap perubahan lingkungan seperti panas kering dan disinfektan kimia tertentu selama waktu yang cukup lama dan dapat bertahan selama bertahun-tahun dalam tanah kering dengan menggunakan sumber nitrogen dan karbon sederhana untuk energi dan pertumbuhannya.

#### 2.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri *Pseudomonas* memiliki karakteristik seperti, gram negatif, berbentuk batang (rods) atau kokus (coccus), aerob obligat, motil mempunyai flagel polar. Pertumbuhan bersifat aerobik, suhu pertumbuhan 20-40°C dengan pH berkisar antara 5-9. Sifat Bakteri ini, oksidase positif, katalase positif, dan nonfermenter. Bakteri *Pseudomonas* mempunyai sifat biokimia yaitu katalase-positif, indol negatif, fermentasi karbohidrat (glukosa, sukrosa dan laktosa) negatif dan urease negative serta mempunyai kemampuan tumbuh pada kondisi yang ekstrim (Suyono dan Salahudin, 2011). Klasifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* menurut Todar (2012) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Bakteri  
Phylum : Proteobacteria  
Class : Gamma Proteobacteria  
Ordo : Pseudomonadales  
Family : Pseudomonadaceae  
Genus : Pseudomonas  
Species : *Pseudomonas aeruginosa*



**Gambar 3. *Pseudomonas aeruginosa* (Purnama et al., 2012)**

*Pseudomonas aeruginosa* adalah bakteri batang Gram negatif, aerob, dan bergerak menggunakan flagel (Milanda et al., 2014). Bakteri *P. aeruginosa* menurut Purwantoro et al. (2016), merupakan bakteri patogen yang dapat menyebabkan berbagai gangguan kesehatan antara lain sepsis pneumonia, infeksi saluran kemih dan bakteremias juga dapat menyebabkan morbiditas dan mortalitas tinggi pada pasien dengan fibrosis kistik karena infeksi kronis yang akhirnya menyebabkan paru-paru mengalami kerusakan dan insufisiensi pernapasan.

## **2.5 Ekstraksi Sampel**

Ekstraksi merupakan suatu proses yang secara selektif memisahkan beberapa zat yang diinginkan dari campurannya dengan bantuan pelarut. Salah satu faktor penting yang menentukan keberhasilan ekstraksi dalam

menggunakan pelarut adalah pemilihan jenis pelarut yang digunakan. Pelarut tersebut akan mempengaruhi jenis senyawa bioaktif yang terekstrak karena masing-masing pelarut mempunyai efisiensi dan selektifitas yang berbeda untuk melarutkan komponen bioaktif (Sartika *et al.*, 2013).

Menurut Mukhriani (2014), Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan. Cara ini sesuai, baik untuk skala kecil maupun skala industri. Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Kerugian utama dari metode maserasi ini adalah memakan banyak waktu, pelarut yang digunakan cukup banyak, dan besar kemungkinan beberapa senyawa hilang. Selain itu, beberapa senyawa mungkin saja sulit diekstraksi pada suhu kamar. Namun di sisi lain, metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil.

Maserasi merupakan cara ekstraksi sederhana yang dilakukan dengan cara merendam bahan dalam pelarut selama beberapa hari pada temperatur kamar dan terlindung dari cahaya (Damayanti dan Endah, 2012). Maserasi bertujuan untuk menarik zat-zat berkhasiat yang tahan pemanasan dan tidak tahan pemanasan. Secara teknologi maserasi mirip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan dengan dilakukan beberapa kali pengocokan dan pengadukan pada temperature ruang suhu kamar.

## 2.6 Identifikasi Fitokimia

Menurut Astuti *et.al.* (2013), uji fitokimia merupakan langkah yang penting untuk memberikan petunjuk jenis dari senyawa aktif, seperti fenolik,

alkaloid, steroid, terpenoid dan flavonoid. Sehingga uji ini termasuk salah satu langkah penting untuk mengungkap potensi sumberdaya tumbuhan sebagai obat. Uji kandungan kimia dilakukan melalui analisis fitokimia secara kualitatif. Uji fitokimia ini masih merupakan suatu metode pengujian awal dalam upaya untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam tumbuhan obat lokal yang berperan penting dalam penyembuhan penyakit (Rohyani, 2015).

Fungsi senyawa metabolit sekunder menurut Musa *et al.* (2017), antara lain sebagai pertahanan tubuh bagi tumbuhan dari serangan hama dan patogen penyebab penyakit, sebagai atraktan hewan polinator dan sebagai hormon pengatur pertumbuhan. Bagi manusia, senyawa metabolit sekunder digunakan sebagai bahan obat-obatan, pewangi, fragran pada makanan dan minuman serta senyawa yang digunakan dalam industri kosmetika.

## 2.7 Pengujian Toksisitas

Menurut Sasmito *et al.* (2015), Pengujian toksisitas penting dilakukan untuk memperkirakan derajat kerusakan yang diakibatkan suatu senyawa terhadap material biologik maupun nonbiologik. Pengujian toksisitas akut dilakukan untuk menentukan efek dari pemberian dosis tunggal suatu senyawa pada hewan. Uji toksisitas dibedakan menjadi uji toksisitas akut, subkronik, dan kronik. Uji toksisitas akut dirancang untuk menentukan Lethal dose atau disingkat LD<sub>50</sub> suatu zat. Uji toksisitas akut dilakukan dengan memberikan zat kimia yang sedang diuji sebanyak satu kali, atau beberapa kali dalam jangka waktu 24 jam. Uji toksisitas akut merupakan uji pra klinik yang bertujuan mengukur derajat efek toksik suatu senyawa dalam waktu tertentu setelah pemberian dosis tunggal (Syamsul *et al.*, 2015).

LC<sub>50</sub> menurut Sukandar *et al.* (2017), adalah konsentrasi dari suatu senyawa kimia yang dapat menyebabkan 50% kematian pada suatu populasi

hewan uji atau makhluk hidup tertentu. Penggunaan  $LC_{50}$  dimaksudkan untuk pengujian ketoksikan dengan perlakuan terhadap hewan uji secara berkelompok yaitu pada saat hewan uji dipaparkan suatu bahan kimia melalui udara maka hewan uji tersebut akan menghirupnya atau percobaan toksisitas dengan media air. Nilai  $LC_{50}$  dapat digunakan untuk menentukan tingkat efek toksik suatu senyawa (Ginting *et. al.*, 2014). Suatu ekstrak dianggap toksik apabila memiliki nilai  $LC_{50} < 1000$  ppm kemudian untuk senyawa murni bisa dikatakan tidak toksik apabila nilai  $LC_{50} < 200$  ppm.

## 2.8 Aktivitas Antibakteri

Antibakteri adalah senyawa yang diproduksi oleh mikroorganisme dan dalam konsentrasi kecil yang mampu menghambat dan bahkan membunuh proses kehidupan mikroorganisme (Menon dan Satria, 2016). Menurut Wiyanto, (2010) antibakteri dikategorikan sebagai bakteristatik jika pada konsentrasi tersebut bakteri tidak mengalami kematian, namun juga tidak tumbuh. Antibakteri dikategorikan sebagai bakteriosidal jika pada konsentrasi tersebut bakteri mengalami kematian. Senyawa antibakteri bekerja dengan cara berinteraksi dengan dinding sel bakteri sehingga mengakibatkan permeabilitas pada sel bakteri dan juga berdifusi ke dalam sel sehingga mengakibatkan pertumbuhan bakteri terhambat (bakteristatik) dan atau mati (bakteriosidal). Selain itu, senyawa antibakteri juga dapat menembus membran dan berinteraksi dengan material genetik sehingga bakteri mengalami mutasi.

Mekanisme penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri oleh senyawa antibakteri menurut Kusmiyati dan Agustin, (2007) yaitu dapat berupa kerusakan dinding sel dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk, perubahan permeabilitas membran sitoplasma sehingga menyebabkan keluarnya bahan makanan dari dalam sel, perubahan



molekul protein dan asam nukleat, penghambatan kerja enzim, dan penghambatan sintesis asam nukleat dan protein. Di bidang farmasi, bahan antibakteri dikenal dengan nama antibiotik, yaitu suatu substansi kimia yang dihasilkan oleh mikroba dan dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain. Senyawa antibakteri dapat bekerja sebagai bakteristatik, bakterisidal, dan bakterilitik.

### 2.8.1 Metode Difusi

Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan, metode difusi dapat dilakukan 3 cara yaitu metode silinder, lubang dan cakram kertas. Metode silinder yaitu meletakkan beberapa silinder yang terbuat dari gelas atau besi tahan karat di atas media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri. Tiap silinder ditempatkan sedemikian rupa hingga berdiri di atas media agar, diisi dengan larutan yang akan diuji dan diinkubasi. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling silinder. Metode lubang yaitu membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diisi dengan larutan yang akan diuji. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling lubang. Metode cakram kertas yaitu meletakkan cakram kertas yang telah direndam larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling cakram (Kusmiyati dan Agustini, 2007).

Menurut Suryani *et al.* (2015), metode sumur (difusi agar) didasarkan pada kemampuan senyawa-senyawa antibakteri yang diuji untuk menghasilkan jari-jari zona penghambatan di sekeliling sumur uji terhadap bakteri yang digunakan sebagai penguji. Metode difusi merupakan metode yang sederhana



dan efektif. Metode difusi berfungsi untuk mengetahui kemampuan antibakteri pada suatu sampel (Sarjono *et.al.*, 2012).

### 2.8.2 Metode Dilusi

Metode dilusi merupakan uji aktivitas antibakteri dimana sejumlah zat antimikroba yang dimasukkan dalam medium bakteriologi yang cair atau padat, dimana digunakan pencernaan dua kali lipat. Manfaat dari metode dilusi yaitu untuk mengetahui banyaknya jumlah zat antimikroba yang diperlukan dalam menghambat pertumbuhan dan membunuh bakteri yang diuji (Harti *et.al.*, 2012).

Metode dilusi menurut Fatisa, (2013) adalah salah satu metode yang digunakan untuk mengetahui potensi suatu senyawa terhadap aktifitas mikroba dengan menentukan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM). Metode dilusi terdiri dari dua teknik pengerjaan, yaitu teknik dilusi perbenihan cair dan teknik dilusi agar yang bertujuan untuk penentuan aktivitas antimikroba secara kuantitatif, antimikroba dilarutkan kedalam media agar atau kaldu, yang kemudian ditanami bakteri yang akan dites (Soleha, 2015).

- **Minimum Inhibitory Concentration (MIC)**

KHM menurut Cappuccino dan Sherman, (2011) merupakan konsentrasi terendah dari senyawa antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan mikrobial uji. Menurut Prihantoro *et al.* (2006), KHM ditandai dengan lebih jernihnya larutan pada tabung perlakuan apabila dibandingkan dengan tabung kontrol bahan.

MIC adalah konsentrasi terendah bakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan hasil yang dilihat dari pertumbuhan koloni pada agar atau kekeruhan pada pembiakan cair (Soleha, 2015). Minimum Inhibitory Concentration (MIC) merupakan analisis deskriptif untuk menentukan konsentrasi terendah dari bahan yang digunakan sebagai antibakteri pengujian untuk menentukan dosis terendah yang dapat membunuh patogen dengan jumlah

paling tinggi. Obat yang paling baik adalah yang memiliki tingkat efektifitas yang tinggi artinya dapat membunuh patogen dalam jumlah besar tetapi tidak membahayakan ikan. Dengan menggunakan metode MIC, dapat ditentukan dosis terendah terhadap bahan-bahan bioaktif antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba (Sudarno *et al.*, 2011).

- **Minimum Bactericidal Concentration (MBC)**

Minimum Bactericidal Concentration (MBC) adalah konsentrasi terendah antibakteri yang dapat membunuh 99,9% pada biakan selama waktu yang ditentukan (Soleha, 2015). Uji MBC (konsentrasi minimal bakterisidal) dilakukan dengan tujuan mengetahui pertumbuhan bakteri pada media pengenceran. Nilai MBC ditentukan dari konsentrasi terendah ekstrak yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan koloni pada cawan petri (Apriyanto *et.al.*, 2014)

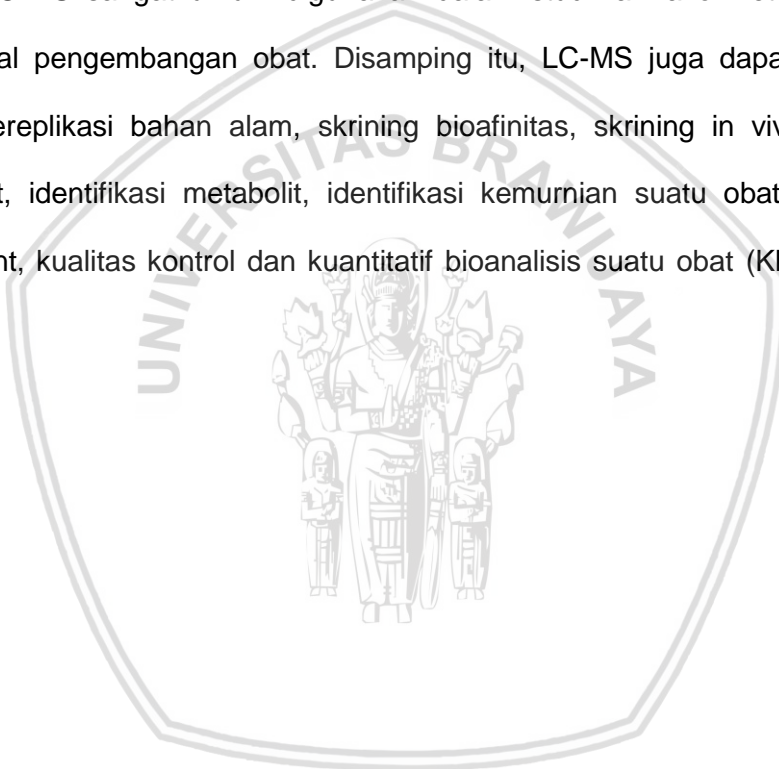
Metode MBC tersebut dilakukan dengan cara mengambil satu ose dari tabung pertama kemudian diinokulasi di masing-masing tabung pada media TSA dalam petridish. Selanjutnya, menginkubasi media yang telah diinokulasi selama 24 jam pada laminar flow. Setelah 24 jam diinkubasi, media inokulan diamati pertumbuhan bakterinya. Apabila terdapat pertumbuhan bakteri artinya ekstrak bioaktif tidak dapat membunuh bakteri pada konsentrasi tersebut sedangkan sebaliknya apabila tidak terdapat bakteri berarti ekstrak bioaktif dapat membunuh mikroba dengan konsentrasi tersebut (Sudarno, *et al.*, 2011).

## **2.9 LC-MS (Liquid Chromatograph Mass Spectrometry)**

Kromatografi adalah suatu teknik pemisahan campuran berdasarkan perbedaan kecepatan perambatan komponen dalam medium tertentu. Prinsip pemisahan kromatografi yaitu adanya distribusi komponen-komponen dalam fasediam dan fase gerak berdasarkan perbedaan sifat fisik komponen yang akan dipisahkan (Ardianingsih, 2009). Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-

MS, atau HPLC-MS) adalah teknik analisis kimia yang dapat mendeteksi kemampuan pemisahan secara fisik dari kromatografi cair (atau HPLC) dengan kemampuan analisis spektrometri. LC-MS adalah teknik yang ampuh digunakan untuk banyak aplikasi yang memiliki sensitivitas dan selektivitas sangat tinggi. LC-MS sangat umum digunakan dalam studi farmakokinetik dan obat-obatan, dengan demikian LC-MS merupakan teknik yang paling sering digunakan di bidang bioanalisis (Patel, 2011).

LC-MS sangat umum digunakan dalam studi farmakokinetika terutama dalam hal pengembangan obat. Disamping itu, LC-MS juga dapat digunakan untuk dereplikasi bahan alam, skrining bioafinitas, skrining in vivo, stabilitas metabolit, identifikasi metabolit, identifikasi kemurnian suatu obat, identifikasi degradant, kualitas kontrol dan kuantitatif bioanalisis suatu obat (Khairan *et al.*, 2009).



### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan untuk penelitian ini adalah daun mangrove *Excoecaria agallocha* yang diperoleh dari Kawasan Konservasi Wonorejo, Rungkut Surabaya, Jawa Timur. Daun di ambil dari bagian dahan pohon mangrove *Excoecaria agallocha*. Bahan-bahan yang digunakan dalam ekstraksi antara lain kertas saring, plastik wrap, alumunium foil dan kertas label, gas nitrogen, pelarut metanol, etil asetat dan n-heksan. Bahan yang digunakan pada screening senyawa fitokimia antara lain aquades, asam sulfat 2 N, asam sulfat pekat, HCl pekat, kloroform, etanol, pereaksi Meyer, FeCl<sub>3</sub> 10%, serbuk magnesium, ammonia pekat dan asam asetat anhidrat. Untuk pengujian toksisitas menggunakan bahan larva *Artemia salina Leach*, air laut, kertas label, dan tissue. Pada pengujian aktivitas antibakteri metode cakram menggunakan bakteri bersifat patogen yaitu *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan kepadatan 10<sup>7</sup> CFU/ml yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, antibiotik *streptomycin*, media Nutrient Agar (NA), kertas cakram, yellow tip, kertas label, alkohol 70%, aquadest, dan tissue. Bahan-bahan yang digunakan untuk uji MIC antara lain antibiotik *streptomycin*, aquadest, kertas label, dan tissue. Untuk uji MBC bahan yang digunakan antara lain media Tripton Soya Agar, kertas label, dan tisu.

##### 3.1.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam ekstraksi antara lain timbangan digital, botol kaca, gelas ukur 100 ml, erlenmeyer, corong, spatula, rotary vacuum evaporator, botol vial, dan kulkas. Pada pengujian kadar air peralatan yang digunakan antara lain timbangan digital, spatula, botol timbang, oven, *crushable*

*tang* dan desikator. Pada screening senyawa fitokimia antara lain, *coolbox*, timbangan analitik, pisau, botol vial, erlenmeyer, cawan penguap, pipet tetes, gelas ukur 100 ml, spatula, tabung reaksi, rak tabung reaksi, loyang, nampan, *crushable tang*, batang pengaduk, corong kaca, dan *rotary vacuum evaporator*. Untuk pengujian toksisitas menggunakan alat akuarium, beaker glass 100 ml, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet serologis, dan bola hisap. Pada pengujian aktivitas antibakteri metode cakram menggunakan alat autoklaf, *Laminar Air Flow*, beaker glass 100 ml, gelas ukur cawan petri, mikropipet, triangle, bunsen, sprayer dan inkubator. Alat-alat yang digunakan untuk uji MIC antara lain tabung reaksi, rak tabung reaksi, mikropipet, pipet serologis, bola hisap, *vortex mixer*, dan inkubator. Untuk uji MBC peralatan yang digunakan adalah beaker glass 100 ml, gelas ukur, cawan petri, dan inkubator.

### **3.2 Metode Penelitian**

#### **3.2.1 Metode**

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen yang bersifat laboratoris. Sagala (2010), menyatakan bahwa eksperimen adalah percobaan yang dilakukan untuk membuktikan sesuatu pertanyaan atau hipotesis tertentu. Percobaan ini dapat dilakukan pada suatu laboratorium atau di luar laboratorium. Metode eksperimen menurut Sugiyono (2011), merupakan percobaan yang dilakukan bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan tersebut terhadap perlakuan yang lain dalam kondisi yang terkendalikan. Penelitian ini terbagi menjadi 2 tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama.

#### **3.2.2 Variabel**

Variabel adalah segala sesuatu yang berbentuk apa saja yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari sehingga akan diperoleh informasi

tentang hal tersebut, kemudian ditarik kesimpulannya. Variabel bebas merupakan variabel yang menjadi sebab timbulnya variabel terikat. Sedangkan variabel terikat itu sendiri merupakan variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat karena adanya variabel bebas (Sugiyono, 2011).

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah perlakuan yang diberikan, yaitu konsentrasi ekstrak. Variabel terikat pada penelitian ini adalah uji daya hambat yang dihasilkan pada kertas cakram, tingkat kekeruhan yang dihasilkan pada media (MIC) dan jumlah koloni yang dihasilkan pada media (MBC) serta hasil uji LC-MS.

### 3.2.3 Parameter Uji

Parameter uji dalam penelitian ini berdasarkan pada daya hambat terbaik yang dihasilkan ekstrak daun *Excoecaria agallocha*. Penentuan daya hambat ekstrak daun mangrove menengan terbaik yang dilakukan dengan mengukur diameter (mm) daerah bening di sekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong atau penggaris. Zona bening yang berada di sekitar kertas cakram yang terlihat setelah inkubasi menunjukkan adanya aktifitas antimikroba. Uji MIC, MBC dilakukan untuk memperoleh informasi mengenai konsentrasi minimum ekstrak yang bersifat bakteristatik atau bakterisidal. Uji toksisitas untuk mengetahui potensi toksisitas dari daun mangrove menengan, serta uji fitokimia, kadar air dan rendemen dari ekstrak daun. Selain itu juga dilakukan uji pendugaan senyawa bioaktif pada ekstrak dengan uji LC-MS.

### 3.2.4 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian pendahuluan dilakukan untuk mengetahui fitokimia, rendemen, serta nilai toksisitas dari sampel daun dengan tiga pelarut yang berbeda, yaitu n-heksan, etil asetat dan metanol sehingga dapat diperoleh pelarut terbaik yang akan digunakan untuk penelitian utama. Penelitian pendahuluan disusun dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana, yaitu



menggunakan 1 faktor dimana dalam faktor tersebut terdiri dari 3 perlakuan dan 6 ulangan sehingga didapatkan 18 satuan perlakuan. Rancangan percobaan penelitian pendahuluan dengan parameter fitokimia, rendemen, kadar air dan nilai toksisitas dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2. Rancangan Percobaan Penelitian Pendahuluan**

Sampel	Pelarut	Ulangan					
		1	2	3	4	5	6
Daun	n-Heksan						
	Etil asetat						
	Metanol						

Penelitian pendahuluan menggunakan analisis data statistik yaitu analisis sidik ragam (ANOVA) dengan selang kepercayaan sebesar 95% dan taraf  $\alpha$  0,05 menggunakan SPSS 16.0. Jika ditemukan perbedaan yang nyata maka akan dilanjutkan dengan uji Tukey.

Rancangan penelitian utama dilakukan untuk mengetahui kosentrasi terbaik aktivitas antibakteri dari daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*) dengan menggunakan pelarut terbaik yang dihasilkan dari penelitian pendahuluan. Penelitian utama disusun dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana, yaitu menggunakan 1 faktor dimana dalam faktor tersebut terdiri dari 5 perlakuan dan 4 ulangan sehingga didapatkan 20 satuan perlakuan. Faktornya adalah kosentrasi ekstrak kasar daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*) yaitu, 100.000 ppm, 75.000 ppm, 50.000 ppm, 25.000 ppm, kloramfenikol (kontrol +) dan DMSO 10% (kontrol -). Rancangan percobaan penelitian utama dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3. Rancangan Percobaan Penelitian Utama**

Konsentrasi	Pelarut	Ulangan			
		1	2	3	4
100.000 ppm	Pelarut terbaik (X)				
75.000 ppm					
50.000 ppm					
25.000 ppm					
DMSO 10%					
kloramfenikol					



Penelitian ini menggunakan analisis data statistik yaitu analisis sidik ragam (ANOVA) dengan selang kepercayaan sebesar 95%. Adapun ANOVA (*Analysis Of Variant*) memiliki model rancangannya sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan:

- $Y_{ij}$  : Hasil pengamatan (parameter yang diuji) pada perlakuan ke-i ulangan ke-j  
 $\mu$  : Nilai rata-rata umum  
 $T_i$  : Pengaruh perbedaan konsentrasi pelarut pada taraf ke-i terhadap parameter  
 $\epsilon_{ij}$  : Pengaruh galat percobaan pada perlakuan ke-i dan ulangan ulangan ke-j  
*i* : Perbedaan konsentrasi pelarut (perlakuan)  
*j* : Ulangan (1, 2, 3)

Pada penelitian yang dilakukan oleh Mpila *et al.* (2012), peningkatan konsentrasi ekstrak menunjukkan semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk, karena semakin meningkatnya senyawa-senyawa berkhasiat dalam ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

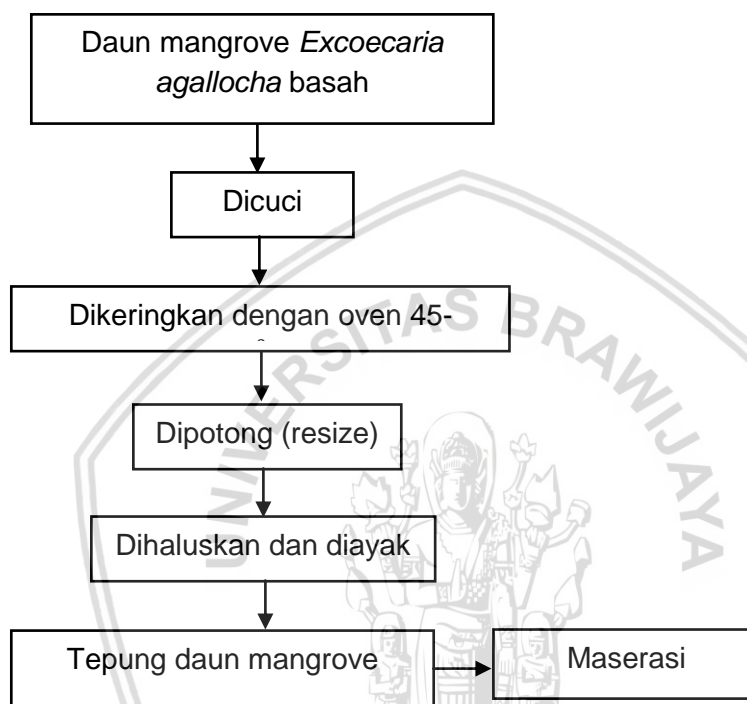
### 3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian dibagi menjadi 2 tahapan, yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Penelitian pendahuluan meliputi proses preparasi bahan baku dan proses ekstraksi menggunakan metode maserasi hingga diperoleh nilai presentase rendemen tiap pelarut, uji kadar air, Uji fitokimia, serta pengujian toksisitas untuk mengetahui nilai  $LC_{50}$ . Penelitian utama meliputi uji aktivitas antibakteri, uji MIC, MBC, dan LCMS.

#### 3.3.1 Preparasi Bahan Baku (Modifikasi Prihanto *et al.*, 2011)

Preparasi bahan baku meliputi pengumpulan daun *Excoecaria agallocha* segar yang diperoleh dari Kawasan Konservasi Wonorejo, Surabaya Jawa Timur. Selanjutnya bahan baku dilakukan pencucian dengan air mengalir lalu dilakukan pengecilan ukuran (*resize*) terlebih dahulu. Bahan baku segar dilanjutkan dengan

proses pengeringan yang dilakukan dengan sinar matahari selama 2 - 3 hari untuk mengurangi kadar air pada bahan baku, lalu dilanjutkan dengan bahan baku kering yang diblender dan diayak dengan ayakan 60 mesh hingga menjadi tepung, kemudian diekstraksi maserasi bertingkat. Prosedur preparasi sampel dapat dilihat pada Gambar 4.



**Gambar 4. Prosedur Preparasi Bahan Baku (Modifikasi Prihanto *et al.*, 2011)**

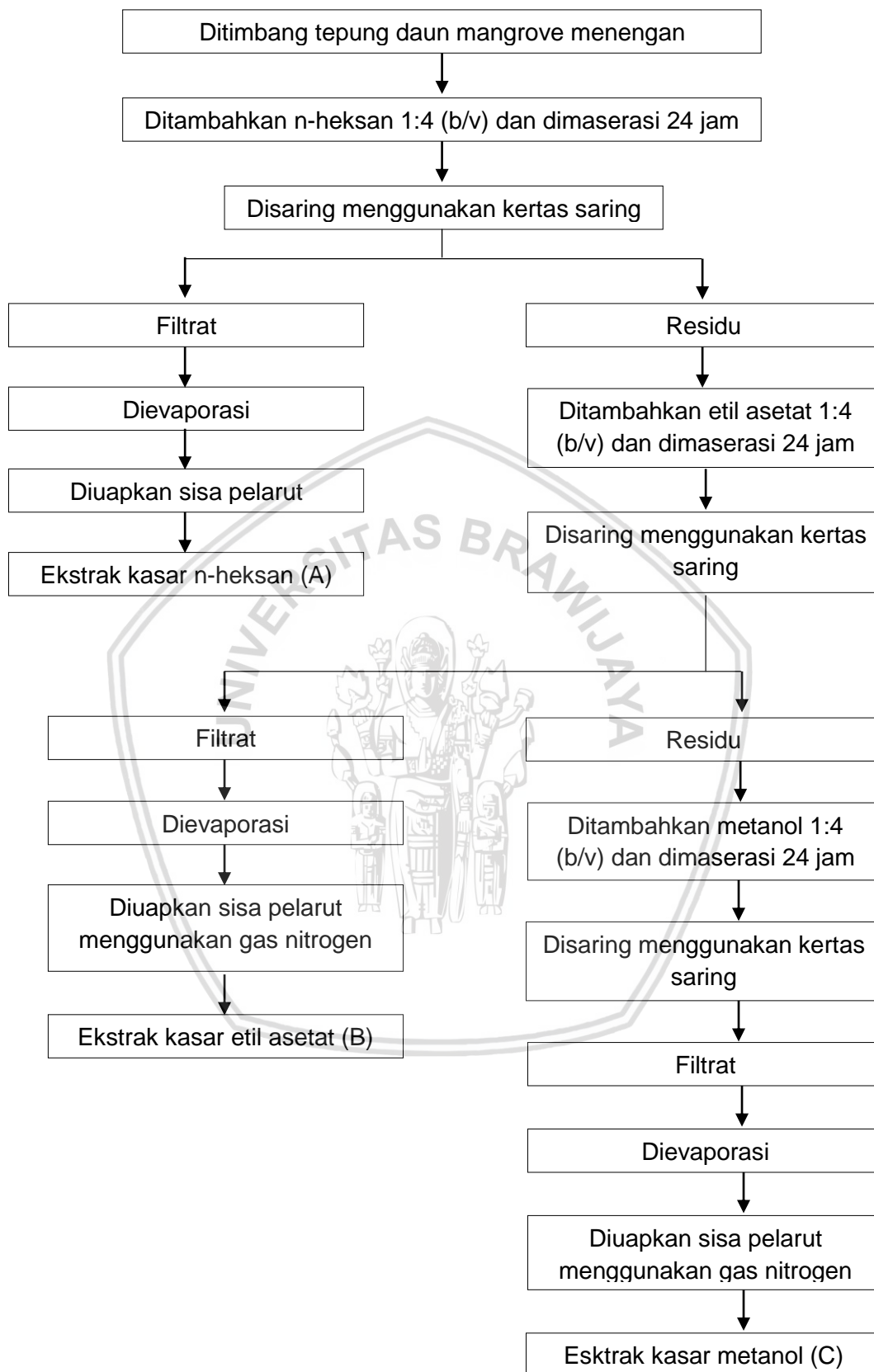
### **3.3.2 Ekstraksi Daun Menengan (*Excoecaria agallocha*) (Modifikasi Alamsyah *et al.*, 2014)**

Proses ekstraksi daun *Excoecaria agallocha* menggunakan metode maserasi bertingkat dengan pelarut metanol (polar), etil asetat (semi polar), dan n-heksan (non polar) dengan perbandingan 1:4 (b/v). Sampel daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*) kering dihaluskan kemudian direndam pada pelarut n-heksan (non polar) dalam botol kaca, botol ditutup rapat dan diberi aluminium foil untuk mencegah terjadinya penguapan. Maserasi dilakukan selama 24 jam pada suhu ruang. Ekstrak kemudian dipisahkan dari residu

dengan penyaringan menggunakan kertas Whatman no. 42. Setelah itu filtrat dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40-50°C untuk menguapkan pelarut. Ekstrak kasar hasil evaporasi diberi gas nitrogen untuk memaksimalkan penguapan pelarut. Diperoleh ekstrak kasar daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*) pelarut n-heksan (A).

Residu hasil dari maserasi menggunakan pelarut n-heksan kemudian ditambahkan pelarut etil asetat (semi polar) 1:4 (b/v) dan dilakukan maserasi selama 24 jam pada suhu ruang. Ekstrak kemudian dipisahkan dari residu dengan penyaringan menggunakan kertas Whatman no. 42. Setelah itu filtrat dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40-50°C untuk menguapkan pelarut. Ekstrak kasar hasil evaporasi diberi gas nitrogen untuk memaksimalkan penguapan pelarut. Diperoleh ekstrak kasar daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*) pelarut etil asetat (B).

Residu hasil dari maserasi menggunakan pelarut etil asetat kemudian ditambahkan pelarut metanol (polar) 1:4 (b/v) dan dilakukan maserasi selama 24 jam pada suhu ruang. Ekstrak kemudian dipisahkan dari residu dengan penyaringan menggunakan kertas Whatman no. 42. Setelah itu filtrat dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40-50°C untuk menguapkan pelarut. Ekstrak kasar hasil evaporasi diberi gas nitrogen untuk memaksimalkan penguapan pelarut. Diperoleh ekstrak kasar daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*) pelarut metanol (C). Hasil dari tiap ekstrak daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*) disimpan pada suhu 4°C untuk digunakan pada analisis selanjutnya. Proses ekstraksi daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*) dapat dilihat pada Gambar 5.



**Gambar 5. Skema Ekstraksi Daun Menengan (*Excoecaria agallocha*)  
Modifikasi (Alamsyah *et al.*, 2014)**

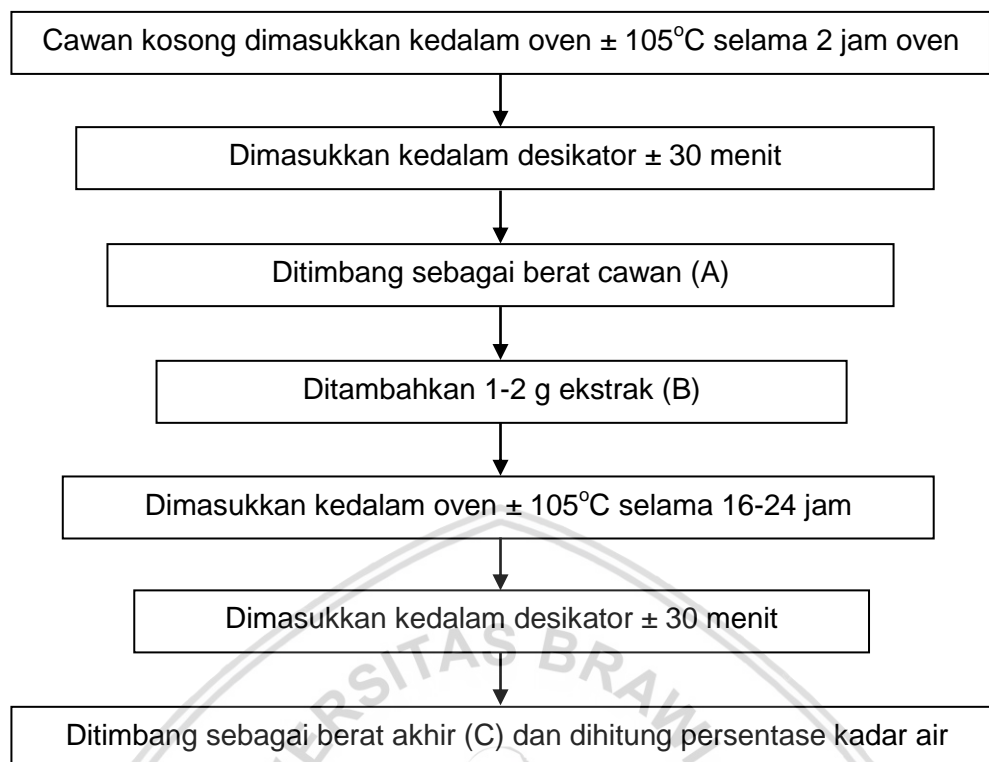
### 3.3.3 Perhitungan Rendemen (Yulia, 2007)

Perhitungan rendemen menunjukkan jumlah ekstrak sampel yang diperoleh dari setiap gram sampel hasil ekstraksi (% b/b). Rumus perhitungan rendemen adalah sebagai berikut:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak (g)}}{\text{berat sampel awal (g)}} \times 100\%$$

### 3.3.4 Uji Kadar Air (BSN, 2006)

Pengujian kadar air dilakukan pada ekstrak kasar daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*) kering menggunakan metode penelitian dari Metode analisis kadar air yaitu menggunakan metode oven kering (metode termogravimetri). Pengujian kadar air yaitu untuk mengetahui kandungan atau jumlah air yang terdapat pada suatu bahan. Langkah pertama adalah mengkondisikan oven pada suhu yang akan digunakan hingga mencapai kondisi stabil. Lalu dimasukkan cawan kosong ke dalam oven dengan suhu  $\pm 105^{\circ}\text{C}$  selama 2 jam. Kemudian pindahkan cawan kosong ke dalam desikator selama  $\pm 30$  menit sampai mencapai suhu ruang dan timbang berat cawan kosong (dihitung sebagai berat A). Selanjutnya ditimbang tiap ekstrak yang telah dihaluskan sebanyak  $\pm 1\text{-}2$  g ke dalam cawan (dihitung sebagai berat B). Lalu dimasukkan cawan yang telah diisi dengan contoh ke dalam oven vakum pada suhu  $95^{\circ}\text{C}\text{-}105^{\circ}\text{C}$ , dengan tekanan udara tidak lebih dari 100 mmHg selama 5 jam atau masukkan ke dalam oven tidak vakum pada suhu  $105^{\circ}\text{C}$  selama 16 jam – 24 jam. Kemudian pindahkan cawan dengan menggunakan alat penjepit ke dalam desikator selama  $\pm 30$  menit kemudian ditimbang (dihitung sebagai berat C). Pengujian dilakukan minimal duplo (dua kali) (BSN, 2006). Skema pengujian kadar air dapat dilihat pada Gambar 6.



**Gambar 6. Skema Pengujian Kadar Air (BSN, 2006)**

Perhitungan pengujian kadar air dapat dilihat dibawah ini.

$$\% \text{ kadar air} = \frac{(A + B) - C}{B} \times 100\%$$

Keterangan:

A= Berat cawan kosong (gram)

B= Berat cawan porselein dan contoh awal (gram)

C= Berat cawan porselein dan contoh kering/akhir (gram)

### 3.3.5 Uji Fitokimia

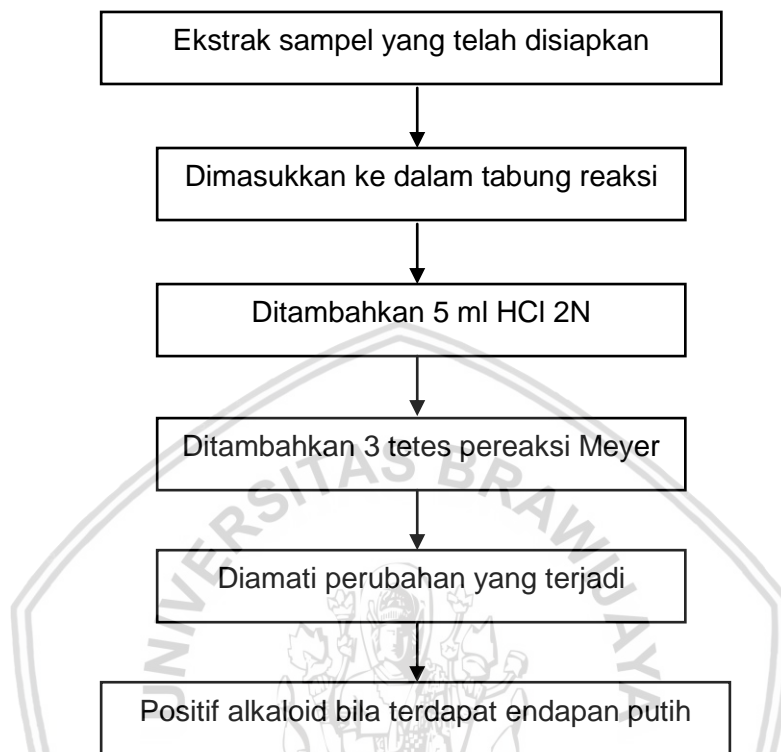
Uji Fitokimia merupakan uji kualitatif yang bertujuan untuk mengetahui senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*) yang diperoleh dari hasil maserasi. Uji fitokimia antara lain uji alkaloid, flavooid, steroid, terpenoid, saponin, dan tanin.

- **Uji Alkaloid (Simaremare, 2014)**

Identifikasi senyawa alkaloid pada ekstrak daun *Excoecaria agallocha* menggunakan prinsip mereaksikan ekstrak sampel dengan HCl dan pereaksi Meyer. Hasil positif uji alkaloid pada pereaksi Meyer ditandai dengan



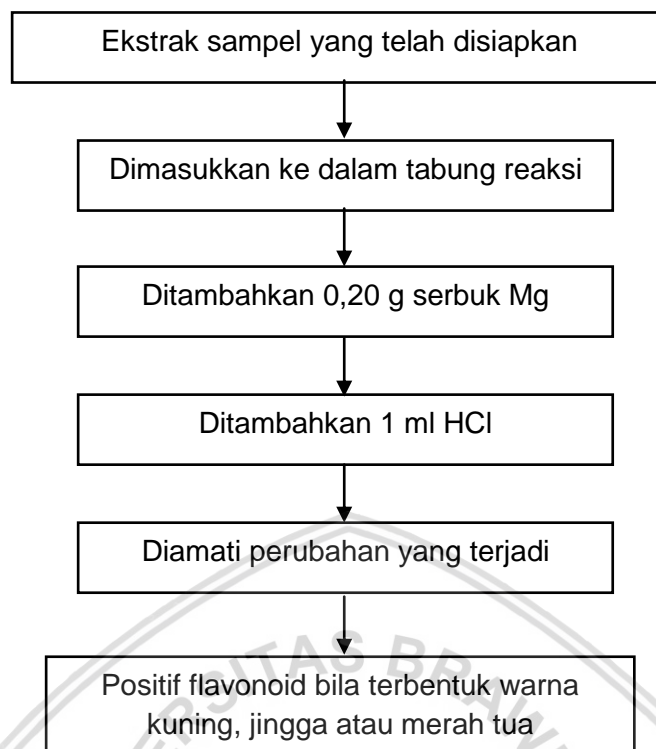
terbentuknya endapan putih. Skema uji alkaloid pada ekstrak daun *Excoecaria agallocha* dapat dilihat pada Gambar 7.



**Gambar 7. Skema Uji Alkaloid (Simaremare, 2014)**

- **Uji Flavonoid (Kasitowati et al., 2017)**

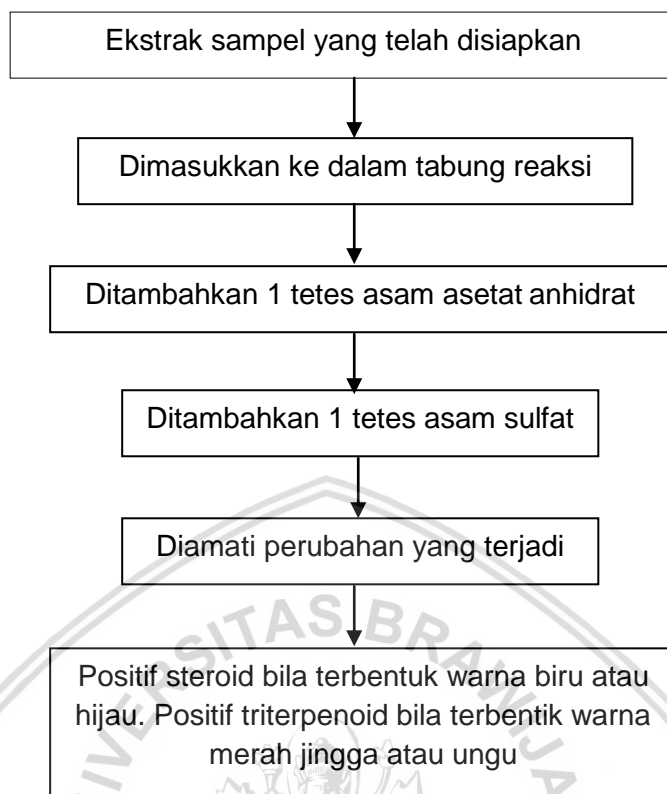
Uji flavonoid pada ekstrak daun *Excoecaria agallocha* menggunakan pereaksi antara lain serbuk Mg dan HCl. Hasil uji sampel positif mengandung flavonoid apabila terbentuk warna kuning sampai jingga. Skema uji flavonoid pada ekstrak daun *Excoecaria agallocha* dapat dilihat pada Gambar 8.



**Gambar 1. Skema Uji Flavonoid (Kasitowati et al., 2017)**

- **Uji Steroid dan Triterpenoid (Mulyani et al., 2013)**

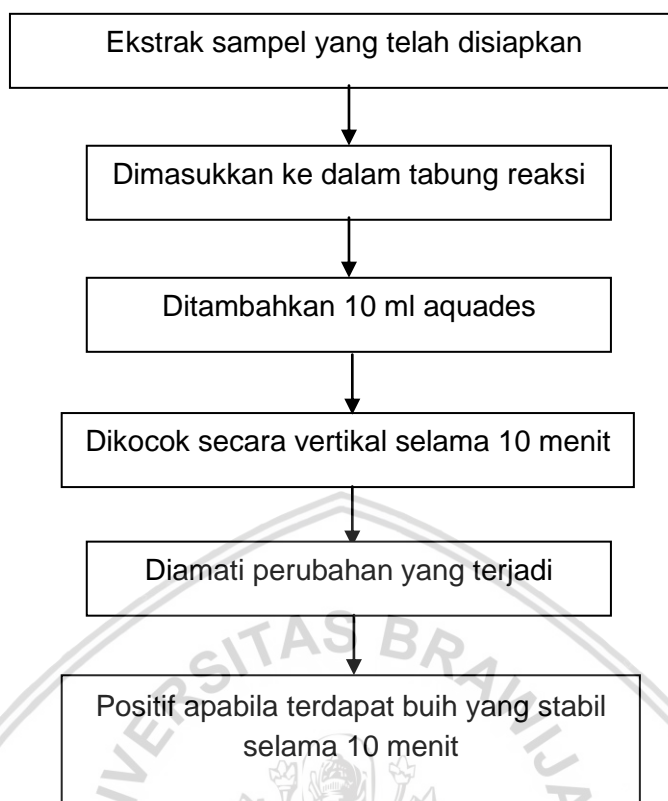
Uji steroid dan triterpenoid pada ekstrak daun *Excoecaria agallocha* menggunakan pereaksi antara lain asetat anhidrat dan asam sulfat. Hasil positif sampel ekstrak mengandung triterpenoid ditandai dengan terbentuknya warna merah jingga atau ungu, sedangkan positif mengandung steroid ditandai dengan terbentuknya warna biru dan jika warna berubah menjadi hijau kebiruan maka positif sterol. Skema uji steroid dan triterpenoid pada ekstrak daun mangrove *Excoecaria agallocha* dapat dilihat pada Gambar 9.



**Gambar 9. Skema Uji Steroid dan Triterpenoid (Mulyani *et al.*, 2013)**

- **Uji Saponin (Minarno, 2015)**

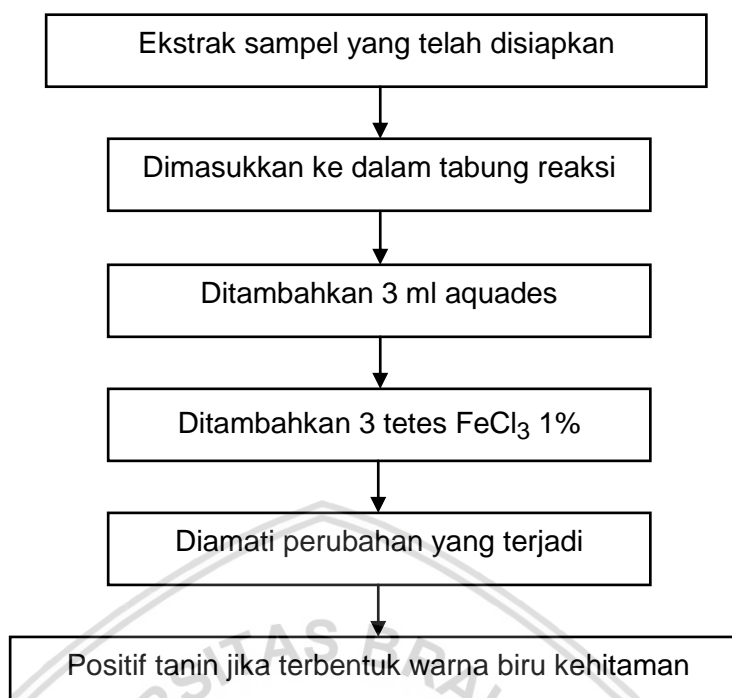
Pengujian saponin dilakukan menggunakan metode Forth yaitu melihat ada atau tidaknya busa yang terbentuk dengan mereaksikan sampel dengan air. Hasil positif mengandung saponin ditandai dengan terbentuknya busa yang stabil dan tidak hilang saat ditambahkan satu tetes HCl. Skema uji saponin ekstrak daun mangrove *Excoecaria agallocha* dapat dilihat pada Gambar 10.



**Gambar 10. Skema Uji Saponin (Minarno, 2015)**

- **Uji Tanin (Danata, 2014)**

Sampel ekstrak daun *Excoecaria agallocha* yang telah disiapkan dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan 3 ml aquades, kemudian ditambahkan 3 tetes pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1%. Adanya senyawa tanin ditandai dengan timbulnya warna hijau hingga biru kehijauan yang menandakan adanya *cathechic tannin* atau biru kehitaman yang menandakan adanya *gallic tannin*. Skema uji tani pada ekstrak daun *Excoecaria agallocha* dapat dilihat pada Gambar 11.

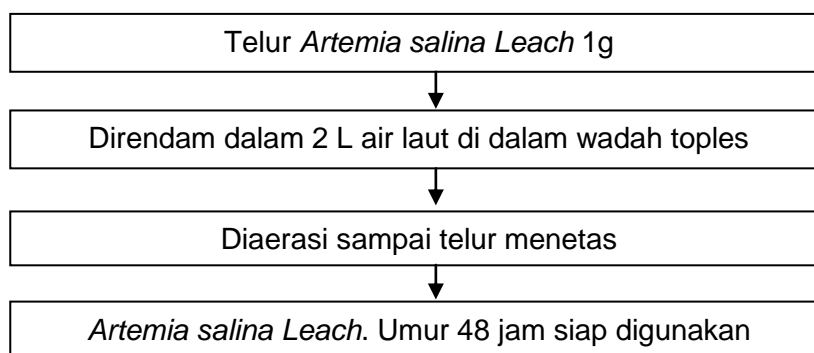


Gambar 11. Skema Uji Tanin (Danata, 2014)

### 3.3.6 Uji Toksisitas (*Brine Shrimp Lethality Test*) (Muaja *et al.*, 2013)

- **Penyiapan Larva *Artemia salina* Leach**

Penyiapan larva *Artemia salina* Leach. dilakukan dengan cara mengambil telur *Artemia salina* Leach. beberapa gram untuk ditetaskan. Telur direndam dalam air laut buatan dan diaerasi selama 48 jam. Air laut buatan dibuat dengan melarutkan 20 g garam tak beryodium ke dalam 1 L air kran, disaring dan diaerasi. Telur *Artemia salina* Leach. tersebut akan menetas menjadi nauplii yang siap digunakan sebagai hewan uji. Skema kerja penetesan telur *Artemia salina* Leach. Skema penyiapan Larva *Artemia salina* Leach dapat dilihat pada Gambar 12.



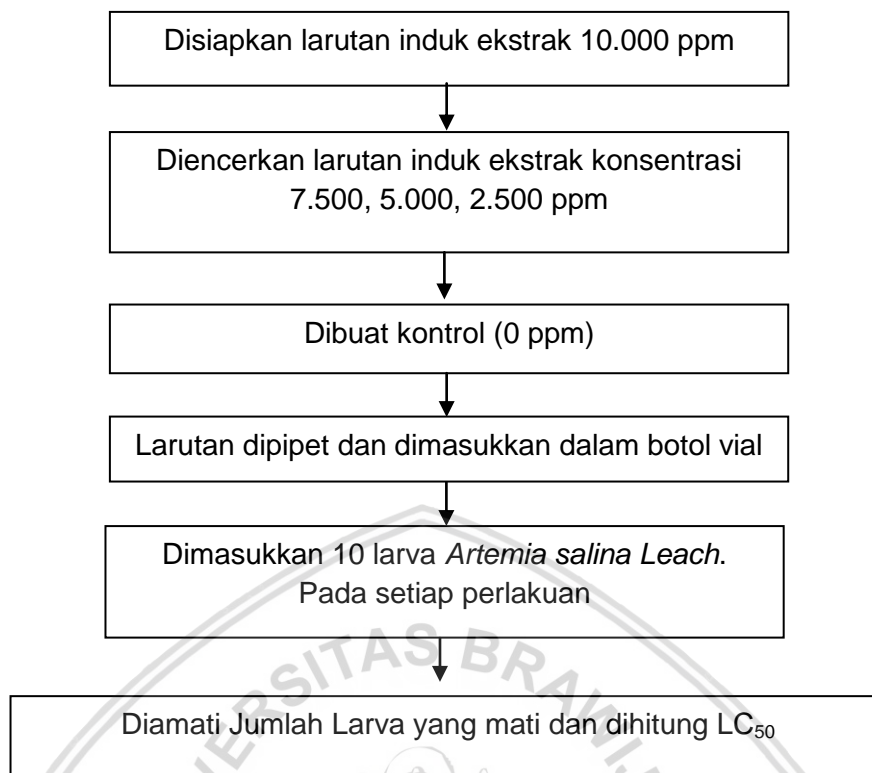
**Gambar 12. Skema Larva *Artemia salina Leach* (Mueja et al., 2013)**

- **Penentuan Konsentrasi Larutan Ekstrak dan Uji Toksisitas *Artemia salina Leach* (Muaja et al., 2013)**

Penentuan konsentrasi larutan uji yang digunakan dimulai dari pembuatan larutan induk dengan konsentrasi 10.000 ppm yang dibuat dari melarutkan 300 mg ekstrak sampel dalam 30 ml air laut. Larutan induk tersebut kemudian di encerkan kembali hingga menghasilkan larutan dengan konsentrasi 7.500, 5.000, 2.500 ppm serta 0 ppm tanpa tambahan ekstrak sampel yang digunakan sebagai kontrol.

Uji toksisitas dilakukan dengan mengisikan 5 ml larutan ekstrak daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*) (ekstrak + air laut) untuk tiap konsentrasinya ke dalam botol vial. Setelah itu 10 ekor larva *Artemia salina Leach*. dimasukkan kedalam masing-masing botol vial tersebut dan setelah 24 jam, kemudian pengamatan jumlah larva *Artemia salina Leach* yang mati. Pengujian Toksisitas dapat dilihat pada Gambar 13.





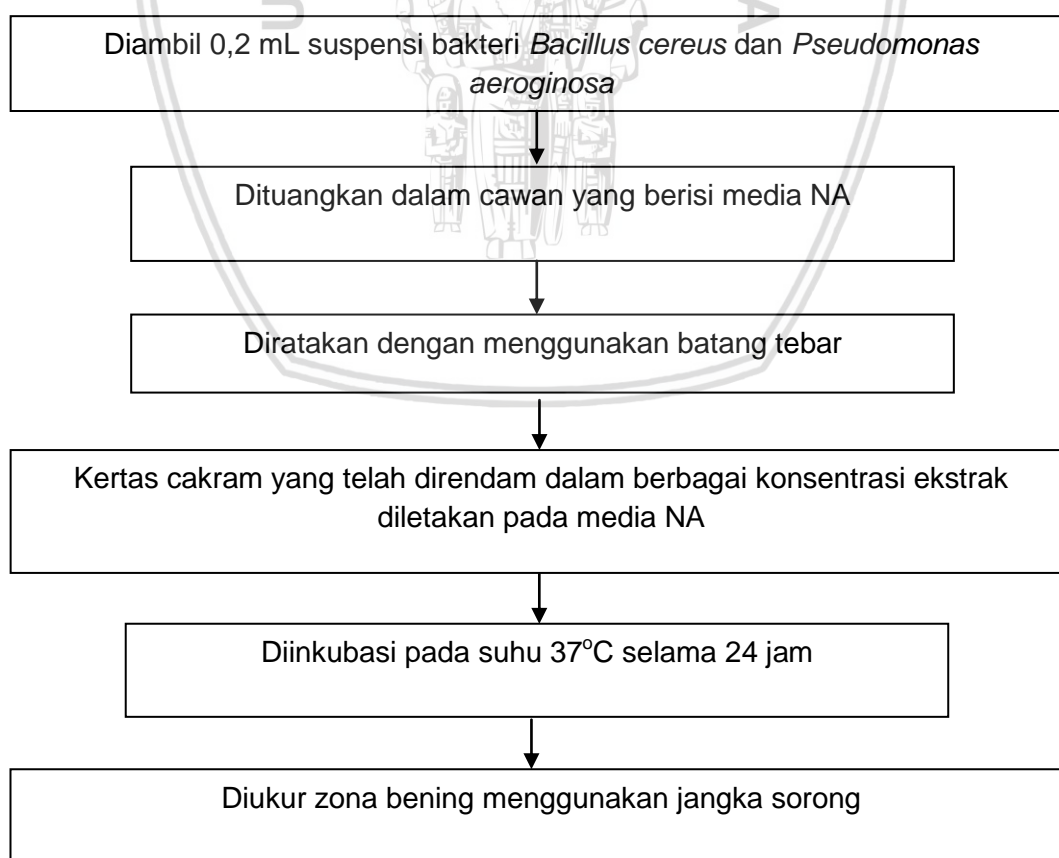
**Gambar 13. Skema Uji Toksisitas Ekstrak Daun Menengan (*Excoecaria agallocha*) (Muaja *et al.*, 2013)**

### 3.3.7 Uji Aktivitas Antibakteri (Metode Difusi Agar) (Jawetz *et al.*, 2008)

Biakan murni bakteri diremajakan pada media agar padat dengan cara bakteri diambil 1 ose lalu jarum ose yang mengandung bakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* digoreskan secara aseptis pada media NA pada cawan yaitu dengan mendekatkan cawan pada nyala api saat menggoreskan jarum ose. Kemudian cawan petri ditutup kembali dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator. Selanjutnya diambil 1 koloni dan ditanam pada media NB, kemudian divortex supaya homogen. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator, pertumbuhan bakteri berlangsung jika media terlihat keruh dan dibandingkan dengan media NB tanpa bakteri.

Suspensi bakteri uji diambil sebanyak 0,2 mL dituangkan dalam media NA yang hangat dalam cawan petri dan diratakan dengan menggunakan batang tebar pada seluruh permukaan media tersebut. Tempelkan kertas cakram (*paper*

*disc*) yang telah direndam pada ekstrak tiap konsentrasi dengan pinset steril pada permukaan media tersebut. Sebagai kontrol positif digunakan kloramfenikol, dan pelarutnya sebagai kontrol negatif. Kontrol positif sebagai tolak ukur menentukan kemampuan ekstrak menghambat bakteri. Jika nilai zona bening yang dihasilkan mendekati atau melebihi nilai kontrol positif maka ekstrak berpotensi sebagai antibakteri. Cawan petri kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Amati hasil dan ukur diameter zona hambat pertumbuhan bakteri dari masing-masing *paper disc*. Kemampuan ekstrak sebagai antimikroba ditunjukkan dengan adanya zona hambat di sekitar *paper disc*. Untuk mendapatkan nilai dari zona hambat yang dihasilkan dilakukan pengukuran dengan menggunakan jangka sorong. Hasil yang didapat kemudian dikurangi dengan diameter kertas cakram yang digunakan (6 mm) Skema pengujian aktivitas antibakteri metode difusi dapat dilihat pada Gambar 14.



**Gambar 14. Skema Uji Aktivitas Antibakteri (Jawetz et al., 2008)**

### 3.3.8 Metode Dilusi MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) menurut (Cepeda *et al.*, 2010) dengan modifikasi

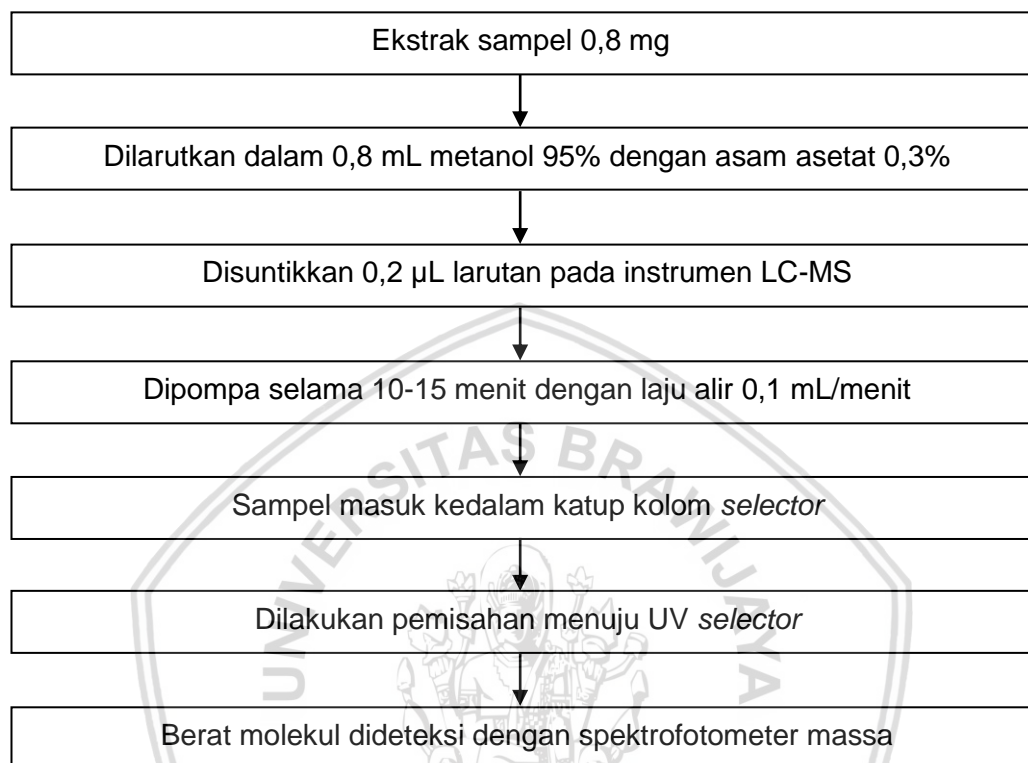
Nilai MIC adalah konsentrasi minimum ekstrak untuk dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Perhitungan MIC dengan cara memplotkan antara  $\ln M_0$  ( $\ln$  konsentrasi ekstrak) pada sumbu X terhadap nilai kuadrat zona penghambat (Z) pada sumbu Y, Perpotongan antara persamaan yang diperoleh dari regresi linear  $Y = a + bX$  dengan sumbu X, merupakan nilai  $M_t$ .  $M_t$  adalah nilai  $\ln$  konsentrasi ekstrak pada perpotongan persamaan regresi linear dan sumbu X. Nilai MIC adalah  $0.25 \times$  nilai konsentrasi ekstrak pada titik  $M_t$ . Sedangkan untuk nilai MBC adalah  $4 \times$  MIC.

### 3.3.9 Analisis Liquid Chromatograph Mass Spectrometry

- Analisis *Liquid Chromatograph Mass Spectrometry* (Lisdiawati *et al.*, 2007)

Analisis *Liquid Chromatograph Mass Spectrometry* (LC-MS) adalah metode yang memisahkan senyawa organik untuk diidentifikasi. Kelebihan dari metode ini adalah lebih sensitif dan selektif jika dibandingkan dengan menggunakan metode deteksi sinar UV biasa. Mula-mula ditimbang 0,8 mg ekstrak kasar daun *Excoecaria agallocha*. Kemudian dilarutkan dalam 0,8 ml metanol 95% dan 0,8 ml asam asetat 0,3%. Sebanyak 0,2  $\mu$ l larutan diatas, disuntikkan dalam instrumen LC-MS dengan kecepatan 0,1 ml/menit. Larutan kemudian dipompa selama 10-15 menit dan masuk kedalam kolom selektor. Selanjutnya dilakukan pemisahan oleh UV detektor. Berat molekul yang dideteksi dihitung dengan spektrofotometer. Skema Analisis *Liquid Chromatograph Mass Spectrometry* dapat dilihat pada Gambar 15. Analisis data LCMS ini menggunakan MassLynx software (Version 4.1) dan identifikasi struktur senyawa

kimia yang terdeteksi pada LCMS dengan database *Chemspider* secara online. Skema pengujian LC-MS dapat dilihat pada Gambar 15 sedangkan cara identifikasi dapat dilihat pada Lampiran.



**Gambar 15. Skema Pengujian LC-MS (Lisdiawati et al., 2007)**

- **Cara penggunaan aplikasi Analisis *Liquid Chromatograph Mass Spectrometry***

Penggunaan aplikasi MassLynx untuk menganalisa data LCMS adalah dengan membuka aplikasi yang telah terinstall di computer. Setelah itu pilih menu Chromatogram, lalu buka file data LCMS yang telah tersimpan di komputer. Pilih menu Display lalu pilih Tic, maka kromatogram akan muncul. Kemudian, pilih salah satu retensi waktu dengan cara klik kanan pada mouse, maka spectrum pada retensi waktu tersebut akan muncul. Pilih menu Tools, lalu Elemental Composition, maka akan muncul kotak dialog. Ketikkan peak yang akan dicari senyawa nya. Hasil peak tersebut akan muncul pada layar, dan cari

senyawa-senyawa yang diduga terdapat pada ekstrak dengan memasukkan rumus molekul ke *Massbank* atau *Chemspider*.

### 3.4 Analisis Data

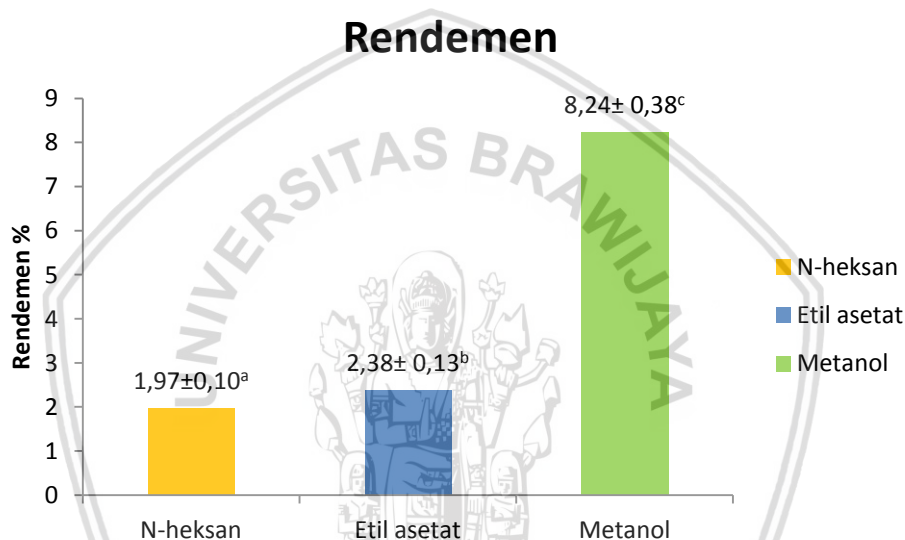
Hasil dari uji antibakteri penentuan zona hambat dengan menggunakan metode cakram diolah dan dianalisis dengan menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*) pada tingkat kepercayaan 95% dan taraf  $\alpha$  0,05 menggunakan SPSS 16.0. Jika ditemukan perbedaan yang nyata maka akan dilanjutkan dengan uji Tukey.



## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Rendemen Ekstrak Kasar Daun Mangrove *Excoecaria agallocha*

Rendemen ekstrak kasar daun menengan didapat berdasarkan perhitungan dari setiap gram sampel hasil ekstraksi (% b/b). Hasil dan perhitungan rendemen dapat dilihat pada lampiran 13. Hasil rendemen ekstrak kasar daun menengan dapat dilihat pada Gambar 16.



**Gambar 16. Hasil Rendemen Ekstrak Kasar Daun Menengan**

Berdasarkan grafik yang terdapat pada Gambar 16, rendemen tertinggi yang diperoleh adalah ekstrak metanol dengan nilai rendemen sebesar  $8,24 \pm 0,38\%$ , sedangkan pada ekstrak etil asetat dan n-heksan masing-masing sebesar  $2,38 \pm 0,13\%$  dan  $1,97 \pm 0,10\%$ . Jenis pelarut yang berbeda dapat mempengaruhi jumlah ekstrak yang dihasilkan, ekstrak menggunakan pelarut pelarut metanol (polar) memiliki rendemen paling tinggi, diikuti rendemen ekstrak dengan menggunakan pelarut etil asetat (semi polar) dan rendemen ekstrak dengan menggunakan pelarut n-heksana (nonpolar) (Romadanu *et al.*, 2014).



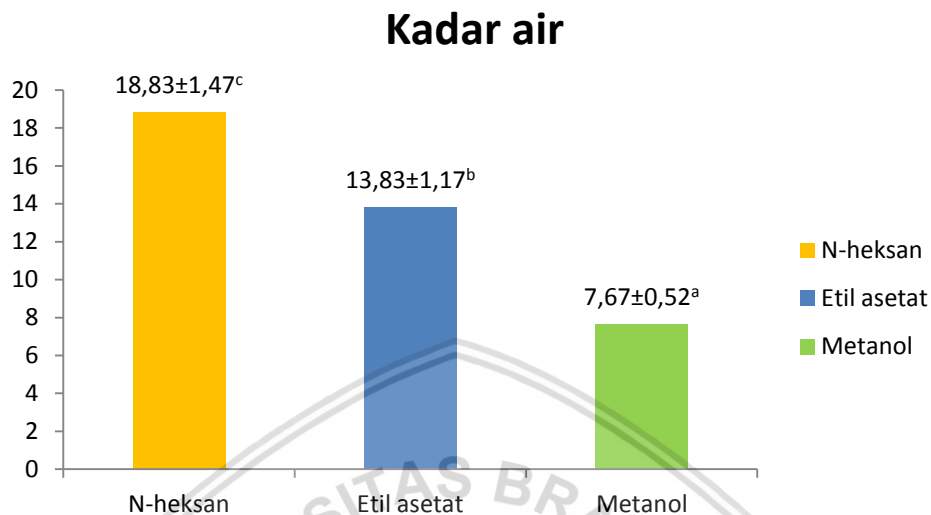
Hasil perhitungan rendemen ekstrak daun mangrove menengan (*Excoecaria agallocha*) dengan pelarut metanol mendapatkan hasil tertinggi, mengindikasikan bahwa pelarut metanol mampu mengekstrak senyawa lebih baik pada daun menengan dibandingkan dengan pelarut lainnya. Besarnya rendemen maksimum dikarenakan setiap pelarut memiliki kepolaran yang berbeda-beda sehingga akan mempengaruhi banyaknya senyawa aktif yang terlarut (Senja *et al.*, 2014). Hal ini dikarenakan pelarut metanol merupakan pelarut yang bersifat universal yang mampu mengikat metabolit sekunder yang bersifat non polar, semi polar, dan polar.

Nilai rendemen tertinggi ekstrak daun sesewanua diperoleh pelarut etanol yaitu 6,6% dengan cara maserasi, nilai rendemen ekstrak hasil maserasi dengan menggunakan pelarut yang berbeda akan menghasilkan rendemen yang berbeda. Hal ini karena tingginya rendemen yang terdapat pada pelarut etanol menunjukkan pelarut tersebut mampu mengekstrak lebih banyak komponen bioaktif yang memiliki sifat kepolaran yang lebih tinggi (Romadanu *et al.*, 2014).

#### **4.2 Kadar Air Ekstrak Kasar Daun Mangrove *Excoecaria agallocha***

Parameter kadar air merupakan pengukuran kandungan air yang berada di dalam bahan, yang bertujuan untuk memberikan batasan minimal atau rentang besarnya kandungan air dalam bahan. Kadar air ekstrak ditetapkan untuk menjaga kualitas ekstrak. Selain untuk menentukan kadar air, pengujian ini juga dapat digunakan untuk menentukan jumlah zat lain yang mudah menguap pada ekstrak. Selain itu, penentuan kadar air berguna untuk mengetahui ketahanan suatu bahan dalam penyimpanannya dan merupakan cara penanganan terbaik bagi suatu bahan untuk menghindari pengaruh aktivitas mikroba. Hasil ANOVA menunjukkan bahwa nilai kadar air ekstrak kasar daun menengan tiap pelarut berbeda nyata ( $P < 0,05$ ), selanjutnya hasil uji lanjut Tukey kadar air dapat dilihat

pada Lampiran 14. Hasil rata-rata dari kadar air ekstrak kasar daun menengan dapat dilihat pada Gambar 17.



**Gambar 17. Hasil Kadar Air Ekstrak Kasar daun menengan**

Berdasarkan hasil pengujian kadar air pada Gambar 17, ekstrak kasar daun menengan dengan pelarut N-heksan memiliki rata-rata kadar air tertinggi yaitu sebesar  $18,83 \pm 1,47\%$ . Ekstrak dengan pelarut etil asetat memiliki nilai kadar air sebesar  $13,83 \pm 1,17\%$  sedangkan ekstrak daun menengan dengan pelarut metanol memiliki kadar air terendah dengan rata-rata sebesar  $7,67\% \pm 0,52\%$ . Jumlah kadar air yang rendah membuat bahan akan lebih tahan disimpan dalam jangka waktu yang relatif lama sehingga kemungkinan rusak karena jamur pada saat penyimpanan sangat kecil. Kadar air ekstrak dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol menunjukkan bahwa ketiga ekstrak termasuk dalam kategori ekstrak kental. Kadar air bahan berpengaruh terhadap masa simpan. Kadar air yang tinggi menyebabkan kerentanan terhadap aktivitas mikroba. Kandungan air dalam ekstrak merupakan media tumbuhnya kapang dan jamur (Guntarti *et al.*, 2015). Menurut Najib *et al.* (2017), pada umumnya kandungan kadar air yang dipersyaratkan adalah kurang dari 10%. Ditambahkan oleh Ratnani *et al.* (2015), menyatakan bahwa kadar air yang melebihi 10% dapat mengakibatkan ekstrak

akan mudah ditumbuhi jamur.

#### 4.3 Fitokimia Ekstrak Kasar Daun Mangrove *Excoecaria agallocha*

Uji kualitatif fitokimia merupakan pengujian untuk mengetahui jenis senyawa metabolit sekunder atau golongan senyawa yang terkandung pada ekstrak daun *Excoecaria agallocha*. Analisis fitokimia ini merupakan suatu metode pengujian awal dalam upaya untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam tumbuhan obat lokal yang berperan penting dalam penyembuhan penyakit (Rohyani *et al.*, 2015). Analisis fitokimia dilakukan dengan melakukan uji alkaloid, uji steroid/triterpenoid, uji flavonoid, uji saponin, dan uji tanin. Hasil analisis fitokimia dari ekstrak kasar daun menengan dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 4. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Kasar Daun *Excoecaria agallocha***

Fitokimia	Ulangan	Pelarut			Keterangan
		N-heksan	Etil Asetat	Metanol	
Alkaloid	1	-	-	-	(+) Terbentuk endapan berwarna putih.
	2	-	-	-	
Flavonoid	1	-	+	++	(+) Terbentuk warna kuning, merah sampai jingga.
	2	-	+	++	
Tanin	1	-	-	++	(+) Terbentuk warna hijau atau biru kehitaman.
	2	-	-	++	
Steroid / Triterpenoid	1	+	+	+	(+) steroid) Terbentuk warna biru atau hijau kebiruan. (+ triterpenoid) Terbentuk warna merah jingga atau ungu.
	2	+	+	+	
Saponin	1	-	-	++	(+) Terbentuk busa stabil.
	2	-	-	++	
Keterangan :					
		-	Tidak Teridentifikasi		+ Intensitas Rendah
		++	Intensitas Sedang		+++ Intensitas Kuat

Berdasarkan hasil uji fitokimia dengan dua ulangan ekstrak kasar daun *Excoecaria agallocha* pada Tabel 4, dapat diketahui bahwa ekstrak n-heksan terdeteksi mengandung steroid. Pada uji fitokimia ekstrak etil asetat terdeteksi mengandung steroid. Sedangkan pada ekstrak methanol menunjukkan hasil positif senyawa metabolit sekunder antara lain, alkaloid, tanin, dan Triterpenoid. Perbedaan hasil antar pelarut ini menunjukkan bahwa setiap pelarut memiliki sifat kepolaran yang berbeda dalam melarutkan komponen bioaktif. Pelarut metanol merupakan pelarut universal sehingga mampu mengekstrak berbagai senyawa metabolit sekunder, baik non polar, semi polar, hingga polar.

Pada uji flavonoid, hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada ekstrak. Senyawa flavonoid tidak terdapat pada ekstrak n-heksan, namun terdapat pada ekstrak etil asetat serta ekstrak metanol dengan warna yang lebih pekat. Uji flavonoid ditandai dengan terbentuk warna orange merah pada ekstrak n-heksan, etil asetat, dan etanol. Hasil positif flavonoid ditandai dengan warna orange merah. Diperkirakan karena terbentuknya garam flavilium (Mulyani *et al.*, 2013).

Pada uji alkaloid dengan reagen Meyer, hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna putih. Namun, pada ekstrak kasar daun menengan tidak terbentuk endapan berwarna putih pada ketiga pelarut. Hal ini disebabkan karena kandungan alkaloid dalam daun menengan sangat kecil sehingga tidak dapat terdeteksi.

Pada uji tanin, indikator positif adalah dengan terbentuknya larutan berwarna hijau atau biru kehitaman. Pada ekstrak metanol terbentuk warna biru kehitaman, sedangkan pada ekstrak n-heksan dan etil asetat menunjukkan hasil negatif. Senyawa tanin bersifat polar sehingga lebih mudah terekstrak dengan pelarut polar, seperti metanol, dibandingkan pelarut non polar atau semi polar. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Rafsanjani dan Putri (2015), bahwa tanin

cenderung polar sehingga pada proses ekstrak tanin lebih banyak larut dalam etanol dan air dibandingkan pelarut etil asetat.

Pada uji steroid dan terpenoid, ekstrak kasar daun menengan dengan pelarut n-heksan dan etil asetat membentuk warna hijau kebiruan yang menunjukkan bahwa ekstrak tersebut positif mengandung senyawa steroid. Hal ini dikarenakan steroid merupakan senyawa yang cenderung larut jika diekstrak menggunakan pelarut non polar atau semi polar, namun juga dapat larut dalam pelarut metanol (polar) dikarenakan sifat metanol sebagai pelarut universal. Menurut Rumagit *et al.* (2015), Pada pengujian steroid menunjukkan hasil positif karena dibuktikan dengan terjadinya perubahan warna larutan menjadi hijau ketika ditambahkan dengan kloroform dan asam sulfat pekat yang menandakan adanya steroid.

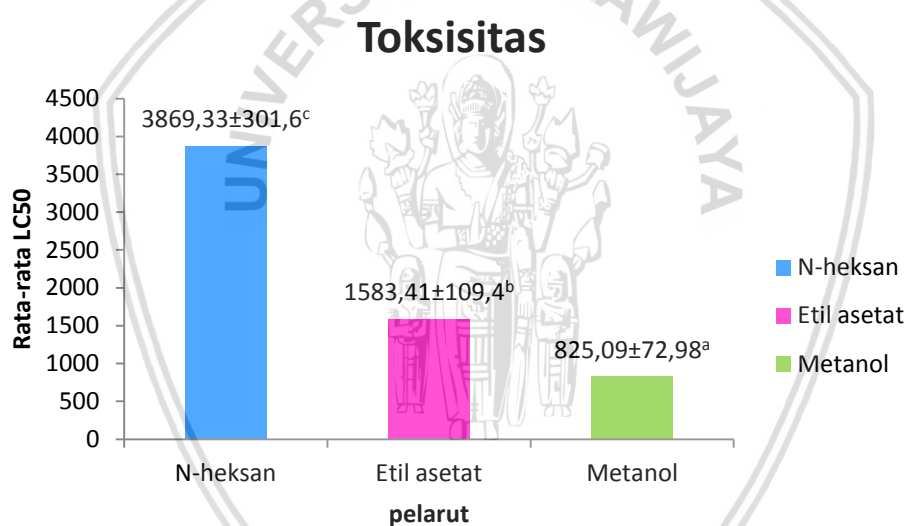
Pada uji saponin menunjukkan adanya saponin yang ditandai dengan adanya busa stabil selama 30 detik pada ekstrak metanol, sedangkan pada ekstrak etil asetat dan ekstrak n-heksan tidak menunjukkan hasil positif. Hal ini dikarenakan senyawa saponin bersifat polar, sehingga dapat diekstraksi dengan pelarut yang bersifat sama. Menurut Pangestuti *et al.* (2017), saponin paling tepat diekstraksi dari tanaman dengan pelarut etanol 70-95% atau metanol. Ekstrak saponin akan lebih banyak dihasilkan jika diekstraksi menggunakan metanol karena saponin bersifat polar sehingga akan lebih mudah larut daripada pelarut lain. Adanya saponin ditandai dengan terbentuknya busa yang stabil setinggi 1-10 cm selama 10 menit dan tidak hilang pada saat ditambahkan dengan satu tetes HCl 2 N (Rasyid, 2012).

#### **4.4 Toksisitas Ekstrak Kasar Daun Mangrove *Excoecaria agallocha***

Pengujian toksisitas dilakukan untuk mengetahui apakah ekstrak kasar daun *Excoecaria agallocha* bersifat toksik atau tidak. Salah satu metode yang

dapat digunakan untuk pengujian toksisitas adalah dengan menggunakan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dengan *Artemia salina* Leach sebagai bioindikator. Nilai  $LC_{50}$  dari tiap ekstrak diperoleh dari hasil perhitungan log konsentrasi terhadap nilai probit. Nilai  $LC_{50}$  menunjukkan besarnya konsentrasi suatu bahan uji yang dapat menyebabkan 50% kematian jumlah *A. salina* Leach setelah perlakuan 24 jam.

Hasil perhitungan ANOVA pada pengujian toksisitas ekstrak kasar daun menengan menunjukkan hasil berbeda nyata ( $P < 0,05$ ), selanjutnya hasil uji Tukey dapat dilihat pada Lampiran 16. Hasil rata-rata dari toksisitas ekstrak kasar daun menengan dapat dilihat pada Gambar 18.



**Gambar 18. Hasil Toksisitas Ekstrak Kasar Daun Menengan**

Berdasarkan grafik pada gambar 18 dapat diketahui bahwa ekstrak kasar daun menengan dengan perlakuan perbedaan pelarut menghasilkan nilai  $LC_{50}$  yang berbeda-beda. Ekstrak metanol daun menengan memiliki rata-rata nilai  $LC_{50}$  terendah, yaitu sebesar  $825,09 \pm 72,98$  ppm. Sedangkan hasil ekstrak etil asetat dan ekstrak n-heksan daun menengan menunjukkan toksisitas yang lebih tinggi, yaitu masing-masing memiliki rata-rata nilai  $LC_{50}$  sebesar  $1583,41 \pm 109,39$  ppm dan  $3869,33 \pm 301,62$  ppm. Uji toksisitas dilakukan untuk



mengetahui efek letal pada suatu senyawa toksik. Pengamatan efek letal, adalah untuk mengetahui kematian biota uji akibat konsentrasi senyawa kimia tertentu yang terkandung dalam suatu limbah, dicatat sebagai median *letal concentration* ( $LC_{50}$ ) (Tyas *et al.*, 2016). Menurut Rohmah *et al.* (2014), semakin tinggi  $LC_{50}$  yang dihasilkan, maka semakin rendahnya toksisitas dan semakin rendah  $LC_{50}$  mencerminkan tingginya tingkat toksisitas. Sifat sitotoksik dapat diketahui berdasarkan jumlah kematian larva pada konsentrasi tertentu. Suatu ekstrak dikatakan toksik jika memiliki nilai  $LC_{50}$  (konsentrasi yang mampu membunuh 50% larva arthemisia) antara 1-10.000 ppm dengan berbagai tingkatan kriteria toksisitas, (Hakim *et al.*, 2010). Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol dari daun mangrove menengan memiliki potensi bersifat toksik jauh lebih baik dari pada ekstrak etil asetat dan n-heksan.

Menurut Lisdawati *et al.* (2006), perbedaan toksisitas sebanding dengan jumlah rendemen ekstrak yang diperoleh, dimana jumlah rendemen ekstrak metanol lebih besar dibandingkan dengan hasil rendemen pelarut etil asetat dan n- heksan. Ini berarti bahwa jumlah metabolit sekunder yang diekstrak pelarut metanol kemungkinan lebih banyak dibanding jumlah metabolit sekunder yang diekstrak dari pelarut non polar.

Menurut Oratmangun *et al.* (2014), yang mengatakan senyawa fitokimia yang memberikan efek toksik adalah flavonoid, dimana pada kadar tertentu memiliki potensi toksisitas akut. Ditambah dengan pernyataan (Pradana *et al.*, 2014), bahwa perbedaan tingkat toksisitas disebabkan oleh senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak tersebut. Cara kerja senyawa bioaktif dengan bertindak sebagai racun perut. Oleh karena itu bila senyawa ini masuk ke dalam tubuh larva, alat pencernaannya akan terganggu. Lapisan kulit yang

tipis pada larva dapat memicu terjadinya difusi zat dari lingkungan yang mempengaruhi metabolisme tubuhnya.

#### 4.5 Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Mangrove *Excoecaria agallocha*

##### a. Metode Difusi

Aktivitas antibakteri pada uji daya hambat metode difusi dapat dilihat dari adanya zona bening yang terbentuk di sekitar cakram. Kekuatan daya hambat berbanding lurus dengan besarnya diameter zona bening dalam satuan milimeter. Pengukuran dilakukan dengan cara menghitung total diameter yang terbentuk dikurangi dengan diameter kertas cakram yang digunakan (6 mm). Pengujian ini dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali.

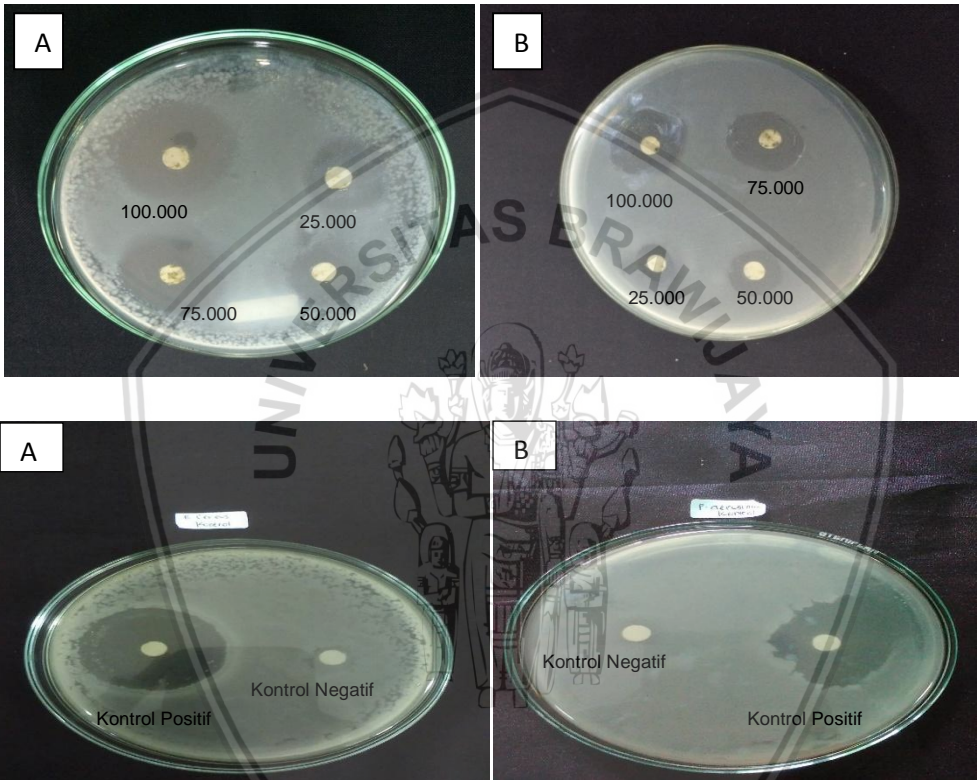
Berdasarkan hasil analisis ANOVA, penggunaan konsentrasi yang berbeda pada pengujian aktivitas antibakteri menunjukkan hasil berbeda nyata ( $P < 0,05$ ), selanjutnya hasil Tukey uji daya hambat ekstrak kasar daun menengan metode difusi dapat dilihat pada Lampiran 18. Hasil rata-rata dari diameter zona hambat pada bakteri *Bacillus cereus* dapat dilihat pada Tabel 5, sedangkan untuk hasil rata-rata diameter zona hambat pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat dilihat pada Tabel 6. Untuk diameter zona bening dari berbagai konsentrasi ekstrak dapat dilihat pada Gambar 19.

**Tabel 5. Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Kasar Daun *Excoecaria agallocha* terhadap Bakteri *Bacillus cereus***

Konsentrasi (ppm)	Diameter Zona Hambat (mm)
0	0,00±0,00 <sup>a</sup>
25.000	7,98±0,43 <sup>b</sup>
50.000	12,18±0,71 <sup>c</sup>
75.000	15,25±0,44 <sup>d</sup>
100.000	18,09±0,43 <sup>e</sup>
Kloramfenikol	26,24±2,45 <sup>f</sup>

**Tabel 6. Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Kasar Daun *Excoecaria agallocha* terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa***

Konsentrasi (ppm)	Diameter Zona Hambat (mm)
0	0,00±0,00 <sup>a</sup>
25.000	5,88±0,67 <sup>b</sup>
50.000	9,07±0,53 <sup>c</sup>
75.000	12,10±0,50 <sup>d</sup>
100.000	15,09±0,38 <sup>e</sup>
Kloramfenikol	24,74±0,80 <sup>f</sup>



**Gambar 19. Zona Bening pada Bakteri *Bacillus cereus* (A) dan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (B)**

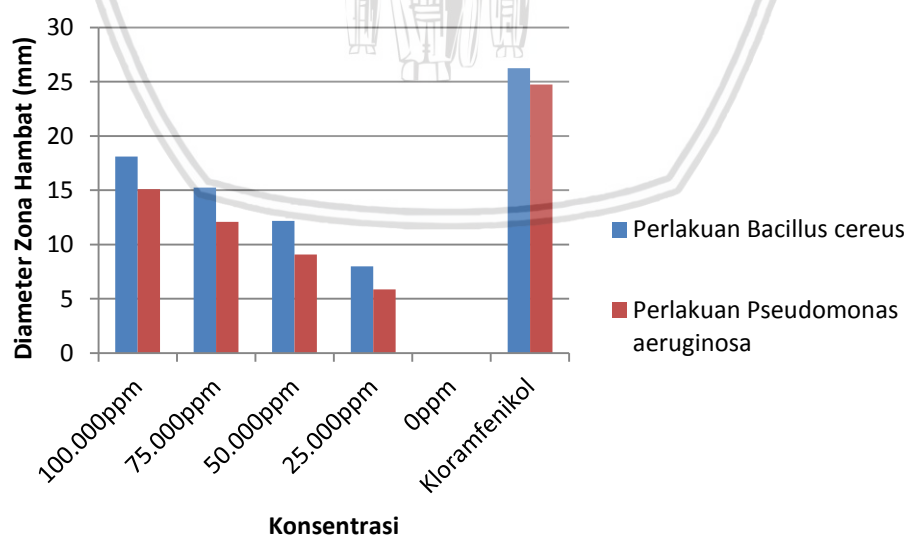
**Tabel 7. Klasifikasi Kekuatan Senyawa Antibakteri**

Diameter Zona Hambat	Kekuatan
>20 mm	Sangat Kuat
10-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
<5 mm	Lemah

Sumber: Davis dan Strout (1971)

Hasil diameter zona hambat ekstrak kasar daun menengan tertinggi adalah pada konsentrasi ekstrak 100.000 ppm, yaitu 18,09±0,43 mm pada bakteri *Bacillus cereus* yang termasuk kategori kuat dan 15,09±0,38 mm pada bakteri

*Pseudomonas aeruginosa* yang termasuk kategori kuat. Zona hambat terendah pada kedua bakteri tersebut terdapat pada konsentrasi 25.000 ppm, yaitu  $7,98 \pm 0,43$  mm pada bakteri *Bacillus cereus* yang termasuk kategori sedang dan  $5,88 \pm 0,67$  mm pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang tergolong kategori sedang. Aktivitas antibakteri ditentukan oleh diameter zona hambat. Suatu antibakteri atau antibiotik dikatakan memiliki aktivitas terhadap bakteri apabila mempunyai kekuatan zona hambat sebagai berikut: apabila memiliki nilai zona hambat dengan ukuran 6-10 mm dikategorikan lemah, 11-20 mm dikategorikan aktif, dan 21-30 mm atau lebih dikategorikan sangat aktif (Muharni *et al.*, 2017). Menurut Putri *et al.* (2017), konsentrasi ekstrak dapat mempengaruhi kecepatan difusi zat aktif, semakin besar konsentrasi ekstrak maka semakin cepat difusi akibatnya makin besar daya antibakteri dan makin luas diameter zona hambatan yang terbentuk. Perbandingan diameter zona hambat ekstrak kasar daun menengan terhadap bakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* dapat dilihat pada Gambar 20.



**Gambar 20. Diameter Zona Hambat Ekstrak Kasar Daun Menengan Terhadap Bakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa***

Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri dengan mengukur zona hambat menggunakan metode difusi cakram pada gambar 9 menunjukkan bahwa kontrol negatif dengan menggunakan DMSO 10% tidak terdapat zona hambat baik pada bakteri *Bacillus cereus* maupun bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Hal ini menunjukkan bahwa DMSO 10% tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji, sehingga penggunaan DMSO 10% sebagai pelarut dalam melarutkan ekstrak kasar daun menengan tidak mempengaruhi ekstrak tersebut dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

Diameter zona hambat yang terdapat pada bakteri *Bacillus cereus* lebih besar dibandingkan diameter zona hambat pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan konsentrasi ekstrak yang sama. Perbedaan diameter zona hambat antara bakteri disebabkan karena perbedaan struktur dinding sel antara bakteri *Bacillus cereus* (bakteri gram positif) dan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (bakteri gram negatif). Struktur dinding sel bakteri gram negative menurut Kusnadi dan Magdalena (2015), lebih kompleks, berlapis tiga, yaitu lapisan luar lipoprotein, lapisan tengah lipopolisakarida yang berperan sebagai penghalang masuknya bahan bioaktif antibakteri, dan lapisan dalam berupa peptidoglikan dengan kandungan lipid tinggi (11-12%). Ditambahkan oleh Manu (2013), pada umumnya bakteri gram positif lebih peka terhadap senyawa antibakteri dibandingkan dengan bakteri gram negatif hal ini dikarenakan dinding sel bakteri gram positif tidak memiliki lapisan lipopolisakarida sehingga senyawa antimikroba yang bersifat hidrofilik maupun hidrofobik dapat melewati dinding sel bakteri gram positif melalui mekanisme difusi pasif selanjutnya berinteraksi langsung dengan peptidoglikan pada sel bakteri yang sedang tumbuh dan menyebabkan kematian sel.



### b. Metode Dilusi

Uji aktivitas antibakteri ekstrak kasar daun *Excoecaria agallocha* dilakukan untuk menentukan nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bacteriocidal Concentration* (MBC). MIC merupakan konsentrasi terendah bakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan hasil yang dilihat dari pertumbuhan koloni pada agar, sedangkan MBC adalah konsentrasi terendah antimikroba yang dapat membunuh 99,9% pada biakan selama waktu yang ditentukan (Soleha, 2015). Pada penelitian ini penentuan dengan menggunakan metode difusi agar (cakram) berdasarkan regresi linier (Bloomfield, 1991). Data hasil uji MIC dan MBC ekstrak daun menengan dapat dilihat pada Lampiran 19 serta Tabel 8.

**Tabel 8. Hasil penentuan MIC dan MBC Ekstrak Daun Mangrove Menengan *Excoecaria Agallocha* terhadap bakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa***

Bakteri	Persamaan Linear	Total Rata-rata Zona Hambat	MIC (ppm)	MBC (ppm)
<i>Bacillus cereus</i>	$y = 19,532x - 16,268$	10,70	0,58	2,30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$y = 12,598x - 11,894$	8,43	0,64	2,57

Berdasarkan tabel di atas dapat dilihat bahwa nilai MIC dan MBC ekstrak daun menengan sudah dapat menghambat bakteri *Bacillus cereus* pada konsentrasi 0,58 ppm dan dapat membunuh *Bacillus cereus* pada konsentrasi 2,30 ppm. Sedangkan pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, ekstrak daun menengan dapat menghambat pada konsentrasi 0,64 ppm dan membunuh pada konsentrasi 2,57 ppm. Nilai MIC dan MBC bakteri *Bacillus cereus* lebih rendah dari pada nilai MIC dan MBC bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Namun hal ini bukan berarti bakteri *Pseudomonas aeruginosa* lebih rentan dari pada *Bacillus cereus*, karena dengan nilai MIC 0,58 g/ml, artinya dengan konsentrasi 0,64 g/ml

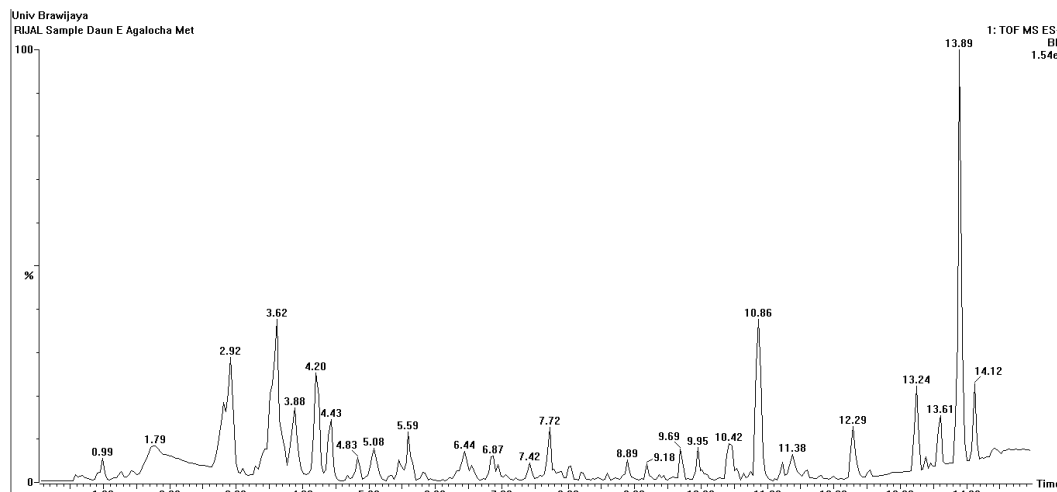


ekstrak kasar daun menengan dapat menghambat *Bacillus cereus* sebesar 10,70 mm. Sedangkan ekstrak kasar daun menengan dengan nilai MIC 0,64 g/ml artinya dengan konsentrasi 0,64 g/ml dapat menghambat pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* sebesar 8,43 mm.

Ekstrak kasar daun menengan dengan konsentrasi 2,30 g/ml dapat membunuh *Bacillus cereus* sebesar 10,70 mm. Sedangkan pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan konsentrasi 2,57 g/ml hanya mampu membunuh sebesar 8,43 mm. Hal tersebut menunjukkan bahwa hasil MIC, MBC dan total rata-rata zona hambat yang dihasilkan lebih baik terhadap bakteri *Bacillus cereus* dari pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Hal ini dikarenakan lapisan dinding sel bakteri gram positif cenderung lebih sederhana dari pada gram negatif. Menurut Cepeda *et al.* (2016), perbedaan nilai hambat minimum bisa disebabkan karena perbedaan sensitivitas bakteri-bakteri terhadap senyawa-senyawa yang ada dalam ekstrak. Menurut Mulaini *et al.* (2016), Semakin rendah nilai MIC dan MBC suatu bahan aktif maka efektivitas bahan tersebut semakin tinggi, demikian pula sebaliknya.

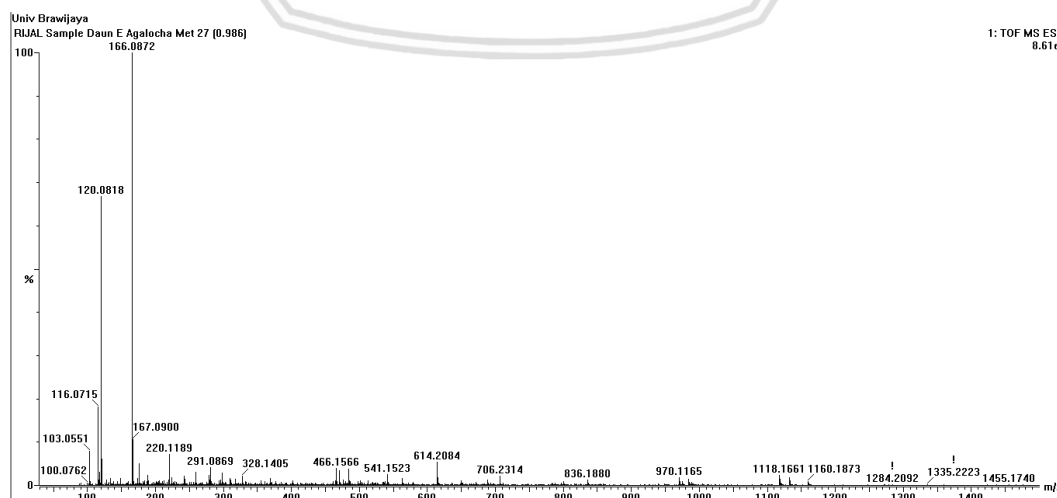
#### **4.6 Identifikasi Senyawa Bioaktif dengan Uji *Liquid Chromatograph Mass Spectrometry* (LC-MS)**

Identifikasi senyawa bioaktif dilakukan dengan metode LC-MS pada ekstrak yang terbaik yaitu ekstrak metanol daun menengan *Excoecaria agallocha*. Kromatografi ekstrak metanol daun menengan *Excoecaria agallocha* dapat dilihat pada Gambar 21.

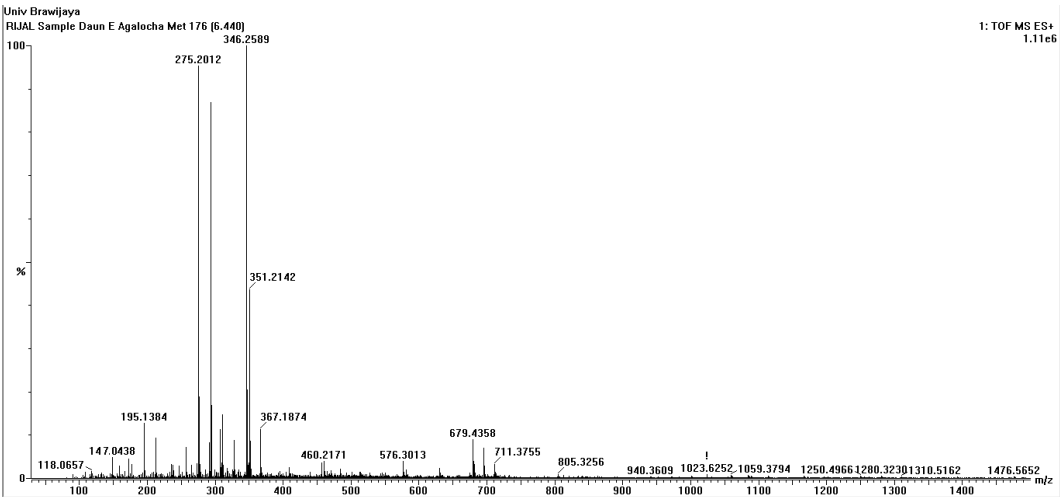


**Gambar 21. Kromatogram Daun *Excoecaria agallocha***

Berdasarkan senyawa hasil kromatogram diatas, dapat diketahui bahwa senyawa-senyawa yang berhasil terlihat pada detik 0,99; 1,79; 2,92; 3,62; 3,88; 4,20; 4,43; 4,83; 5,08; 5,59; 6,44; 6,87; 7,42; 7,72; 8,89; 9,18; 9,69; 9,95; 10,42; 10,86; 11,38; 12,29; 13,24; 13,61; 13,89. Senyawa yang teridentifikasi dari dua puluh lima retensi waktu tersebut hanya ada tiga yaitu pada detik 0,99 6,44; 8,09; dan 14,12. Puncak masing-masing yang dihasilkan pada masing-masing waktu retensi daun *Excoecaria agallocha* dapat dilihat pada Gambar 22, Gambar 23, Gambar 24, dan Gambar 25. Senyawa yang terdapat pada ekstrak methanol daun *Excoecaria agallocha* dapat dilihat pada Tabel 9.



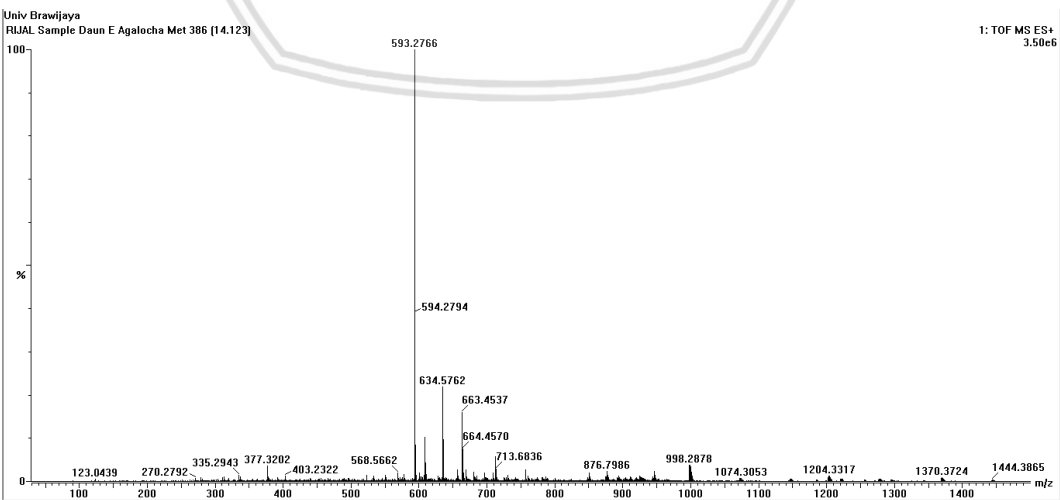
**Gambar 22. Spektrum Massa Waktu Retensi 0,99**



Gambar 23. Spektrum Massa Waktu Retensi 6,44



Gambar 24. Spektrum Massa Waktu Retensi 8,09



Gambar 25. Spektrum Massa Waktu Retensi 14.12

**Tabel 9. Senyawa yang Terdapat Pada Ekstrak Metanol Daun *Excoecaria agallocha***

Perlakuan (sampel)	Waktu Retensi	Massa Senyawa	Dugaan Senyawa	Rumus Molekul
Daun	0,99	291.0869	Epicatechin	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub>
Menengan	6,44	147.0438	Coumarin	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>
	8,09	331.0812	Rhamnazin	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> O <sub>7</sub>
	14,12	123.0439	Benzoic acid	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>

Tipe procyanidin adalah anggota proanthocyanidin golongan tanin yang merupakan senyawa oligomer, yang terbentuk dari molekul catechin dan epicatechin. Tanin bakau/mangrove umumnya lebih banyak mengandung procyanidin dibanding dengan prodelphinidin (Kasmudjiastuti, 2014).

Kumarin merupakan golongan senyawa fenilpropanoid yang memiliki cincin lakton lingkaran enam dan memiliki inti 2H-1-benzopiran-2-on dengan rumus molekul C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>. Kumarin dan turunannya banyak memiliki aktivitas biologis diantaranya dapat menstimulasi pembentukan pigmen kulit, mempengaruhi kerja enzim, antikoagulan darah, antimikroba, dan menunjukkan aktivitas menghambat efek karsinogen (Isnawati *et al.*, 2008).

Rhamnazin memiliki rumus molekul C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>O<sub>7</sub> yang merupakan senyawa turunan flavonoid. Menurut Tringali (2001), senyawa flavonoid yang telah dilaporkan efektif menghambat peroksidasi asam linoleat dan mencegah pembentukan anion superoksida antara lain quersetin, isorhamnetin dan rhamnazin. Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenol dan memiliki mekanisme kerja dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara inaktivasi protein (enzim) pada membran sel sehingga mengakibatkan struktur protein menjadi rusak (Mahanani *et al.*, 2012).

Beberapa senyawa antibakteri seperti benzaldehida, fenolik, dan asam benzoat dapat merusak membran sel dan menyebabkan kebocoran metabolit seluler seperti keluarnya ion-ion Ca<sup>++</sup>, K<sup>+</sup>, dan asam-asam amino. Gangguan pada membran sel seperti penyerapan nutrisi, produksi energi dan transport

elektron (Nychas, 1995). Schiff base dan senyawa kompleksnya, berhasil disintesis dari salisil aldehyd serta o-amino asam benzoat, logam yang dipilih sebagai kompleks adalah Cu, Ni, Fe, serta Zn. Schiff base dan juga kompleksnya ini telah diuji untuk aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen seperti bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, dan *Klebsiella pneumonia* (Sirumapea dan Anggraini, 2016).



## 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

- Penggunaan konsentrasi ekstrak kasar daun menengan *Excoecaria agallocha* yang berbeda memberikan pengaruh yang nyata, dimana semakin tinggi konsentrasi maka semakin besar pula kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa*.
- Ekstrak kasar daun menengan *Excoecaria agallocha* menghasilkan diameter zona hambat tertinggi dengan konsentrasi 100.000 ppm sebesar  $18,09 \pm 0,43$  yang tergolong kuat pada bakteri *Bacillus cereus* dan  $15,09 \pm 0,38$  yang tergolong sedang pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.
- Ekstrak kasar daun menengan *Excoecaria agallocha* mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus* sebesar 10,70 mm pada konsentrasi 0,58 ppm dan mampu membunuh *Bacillus cereus* sebesar 10,70 mm pada konsentrasi 2,30 ppm. Pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* mampu menghambat sebesar 8,43 mm pada konsentrasi 0,64 ppm dan membunuh sebesar 8,43 mm pada konsentrasi 2,57 ppm.

### 5.2 Saran

Saran dari penelitian ini adalah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai ekstrak murni dari daun menengan (*Excoecaria agallocha*) yang memiliki potensi sebagai antibakteri agar dapat diaplikasikan dalam bentuk obat pada penelitian selanjutnya.



## DAFTAR PUSTAKA

- Aksara, R., W. J. A. Musa, dan L. Alio. 2013. Identifikasi Senyawa Alkaloid Dari Ekstrak Metanol Kulit Batang Mangga (*Mangifera indica* L). Jurnal Entropi. **8** (1): 514-519
- Alamsyah, Heru K., Ita Widowati, Agus Sabdono. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rumput Laut *Sargassum cinereum* (J.G. Agardh) dari Perairan Pulau Panjang Jepara Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus epidermis*. *Journal Of Marine Research* **3** (2) : 69-78
- Amanati, Lutfi. 2014. Uji Bakteri *Staphylococcus Aureus* Dan *Bacillus Cereus* Pada Produk Mi Instan Yang Beredar Di Pasaran Balai Riset dan Standardisasi Industri Surabaya BLI. **3** (2): 73 – 80
- Amelia, R. F. 2015. Penentuan Jenis Tanin Dan Penetapan Kadar Tanin Dari Buah Bungur Muda (*Lagerstroemia Speciosa* Pers.) Secara Spektrofotometri Dan Permanganometri Jurnal Ilmiah Mahasiswa Universitas Surabaya. **4** (2): 1-20
- Anzharni Fajrina Junuarty Jubahar, A. F. J. dan S. Sabirin. 2016. Penetapan Kadar Tanin Pada Teh Celup Yang Beredar Dipasaran Secara Spektrofotometri UV-VIS. Jurnal Farmasi Higea. **8** (2): 113-142
- Apriyanto, H., Harpeni, E., Setyawan, A., dan Tarsim. 2014. Pemanfaatan Ekstrak Buah *Rhizophora* sp. Sebagai Anti Bakteri Terhadap Bakteri Patogen Ikan Air Tawar. E-junal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan. **3**(1): 290-296
- Ardianingsih, Retno. 2009. Penggunaan High Performance Liquid Chromatography(Hplc) Dalam Proses Analisa Deteksi Ion. Berita Dirgantara. **10** (4): 101- 104
- Astuti, J., Rudiyanasyah, dan Gusrizal. 2013. Uji Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Tumbuhan Paku Uban (*Nephrolepis biserrata* (Sw) Schott). *JKK*. **2**(2):118-122.
- Astuti, M. D., T. Sriwinarti, dan K. Mustikasari. 2017. Solasi Dan Identifikasi Senyawa Terpenoid Dari Ekstrak N-Heksana Daun Kelopak Tambahan Tumbuhan Permot (*Passiflora Foetida* L). Sains dan Terapan Kimia. **11** (2): 80 – 89
- Bonang, G. dan E. S. Koeswardono. 1982. Mikrobiologi Kedokteran untuk Laboratorium dan Klinik. Gramedia. Jakarta. 199 hlm.
- Badan Standarisasi Nasional. 2006. Penentuan Kadar Air pada Produk Perikanan. SNI 01 2354-2-2006
- Cappuccino, J. G., dan Sherman, N. 2011. Microbiology a Laboratory Manual 9th edition. Pearson Benjamin Cumming, San Fransisco. Halaman 7.

- Cepeda, G.N., Ratih D.H., dan Supar. 2010. Penghambatan Ekstrak Etanol Sereh (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) terhadap Produksi Verotoksin *Escherichia coli* Verotoksigenik. *Jurnal Natur Indonesia*. **13** (1): 72-76.
- Chen, Yaping, Yong Ye. 2014. Effect of Salinity and Nutrient Addition on Mangrove *Excoecaria agallocha*. Response of *E.agallocha* to Salinity and Nutrient **9** (4) : 1-11
- Damayanti, A. dan Ayu, Endah. F. 2012. Pemungutan Minyak Atsiri MAwar (*Rose oil*) Dengan Metode Maserasi. *Jurnal Bahan Alam Terbarukan*. **1**(2).
- Danata, Ridha H., Ade Yamindago. 2014. Analisis Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Mangrove *Avicennia marian* di Kabupaten Trenggalek dan Kabupaten Pasuruan Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Vibrio alginolyticus*. *Jurnal Kelautan* **7** (1) : 12-19
- Deepa, M. dan C. K. Padmaja. 2014. A Study On The Antibacterial Effects Of The Various Extracts Of *Excoecaria Agallocha* L. *Int J Pharm Bio Sci*. **5** (4): 169 – 178
- Fatisa. Y. 2013. Daya Antibakteri Estrak Kulit Dan Biji Buah Pulasan (*Nephelium Mutabile*) Terhadap *Staphylococcus Aureus* Dan *Escherichia Coli* Secara In Vitro. *Jurnal Peternakan*. **10** (1): 31 - 38
- Firdiyani, F., Winarni, T. A., dan Farid, Ma'ruf. W. 2015. Ekstraksi Senyawa Bioaktif Sebagai Antioksidan Alami *Spirulina platensis* Segar dengan Pelarut yang Berbeda. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. **18** (1).
- Gunawan, I W. G., I. G. A. G. Bawa, dan N. L. Sutrisnayanti. 2008. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Terpenoid Yang Aktif Antibakteri Pada Herba Meniran (*Phyllanthus Niruri Linn*). *Jurnal Kimia*. **2** (1): 31-39
- Guntarti, A., K. Sholehah, N. Irna, Dan W. Fistianingrum. 2015. Penentuan Parameter Non Spesifik Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana*) Pada Variasi Asal Daerah. *Farmasains*. **2** (5): 202-207
- Harborne, J.B. 1987. Metode Fitokimia Edisi ke dua. ITB. Bandung. 354 halaman.
- Haribi, R. dan K. Yusron. 2010. Pemeriksaan *Escherichia Coli* Pada Air Bak Wudhlu 10 Masjid Di Kecamatan Tlogosari Semarang. **3** (1): 21-26
- Harti. S. A., Nur, Kusumawati. H., dan Estuningsih. 2012. Perbandingan Uji Aktivitas Anti Bakteri Chitooligosakarida Terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureu* ATCC 25923 dan *Salmonella typhi* Secara *in vitro*. Jurusan Akupuntur Politeknik Kesehatan Surakarta.
- Hakim Luqman, dkk. 2010. Produksi Panel Dinding Bangunan Tahan Gempa dan Ramah Lingkungan dari Limbah Bahan Berbahaya dan Beracun Industri Minyak dan Gas. *Jurnal Sains dan Teknologi Lingkungan* **2** (2): 97-110.

- Hossain, Sheikh J., Hitoshi Aoshima, Magdi El-Sayed, Firoj Ahmed. 2009. Antioxidant and Anti-Histamine-Release Activities of *Excoecaria agallocha* L. *Pharmacologyonline* **2** : 927-936
- Isdawati, V., S. wiryowidagdo, Dan L. B. S. Kardono. 2006. Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Dari Berbagai Fraksi Ekstrak Daging Buah Dan Kulit Biji Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*). *Penelitian Kesehatan*. **34** (3): 11 - 1 18
- Jawetz, E., J. L. Melnick, dan E. A. Adelbergs. 2008. Mikrobiologi Kedokteran Edisi 23. Salemba Medika. Jakarta. 854 hlm.
- Jaedun, A. 2011. Metodologi Penelitian Eksperimen. In Service 1. Yogyakarta. 12 hlm.
- Kaliampurthi, Satyavani, Gurudeeban Selvaraj, Ramanathan Thirugnanasambandam. 2014. Documentation of Hypoglycemic and Wound Healing Plants in Kodyampalayam Coastal Village (Southeast Coast of India). *Journal of Coastal Life Medicine* **2** (8) : 656-661
- Kasitowati, R.D., Ade Yamindago, Mila Safitri. 2017. Potensi Antioksidan dan Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Mangrove *Rhizophora mucronata*, Pilang Probolinggo. *Journal of Fisheries and Marine Science* **1** (1) : 72-77
- Kasmudjiastuti, E. 2014. Karakteristik Kulit Kayu (*Ceriops tegal*) Sebagai Bahan Penyamak Nabati. *Artikel Kulit, Karet, dan Plastik*. **30** (2): 71-78.
- Khotimah. Y. dan J. Kusnadi. 2014. Ktivitas Antibakteri Minuman Probiotik Sari Kurma (*Phoenix Dactilyfera* L.) Menggunakan *Lactobacillus Plantarum* Dan *Lactobacillus Casei*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. **2** (3): 110-120
- Kusmiyati, dan N. W. S. Agustini. 2007. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Porphyridium cruentum*. *Biodiversitas*. **8** (1) : 48-53
- Magdalena, N. V., Dan J. Kusnadi. 2015. Antibakteri Dari Ekstrak Kasar Daun Gambir (*Uncaria gambir* var Cubadak) Metode Microwave-Assisted Extraction Terhadap Bakteri Patogen. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. **3** (1): 124-135
- Mailia. R., B. Yudhistira<sup>1</sup>, Y. Pranoto, S. Rochdyanto, dan E. S. Rahayu. 2015. Ketahanan Panas Cemaran *Escherichia Coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Bacillus Cereus* Dan Bakteri Pembentuk Spora Yang Diisolasi Dari Proses Pembuatan Tahu Di Sudagaran Yogyakarta. *Agritech*. **35** (3): 300-308
- Manu, R. R. S. 2013. Aktivitas Antibakteriekstrak Etanol Daun Baluntas (*Pluchea indica* L) Terhadap *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa* . *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Universitas Surabaya*. **2** (1): 1-10
- Menon, Sanjiv dan A. Satria. 2016. Mengkaji Aktivitas Antibakteri *Nasturtium officinale* dan Ekstrak Etanol *Pilea melastomoides* terhadap *Escherichia coli*. *farmaka Suplemen*. **15** (1): 63-69

- Milanda, T., L. K. Dewi, dan S. A. F. Kusuma. 2014. Deteksi Gen Resistensi Kloramfenikol (cat) pada *Pseudomonas aeruginosa* Isolat Klinik dengan Metode Polymerase Chain Reaction. *Jurnal Farmasi Klinik Indonesia*. **3** (4): 141–150
- Minarno, Eko B. 2015. Skrining Fitokimia dan Kandungan Total Flavonoid Pada Buah *Carica pubescens* Lenne & K. Koch di Kawasan Bromo, Cangar dan Dataran Tinggi Dieng. *El-Hayah* **5** (2) : 73-82
- Mpila, D. A., Fatimawali dan W.I. Wiyono. 2012. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mayana (*Coleus atropurpureus* [L] Benth) terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* secara In-Vitro. *Pharmacon*. **1** (1): 13-21
- Muaja, A., H.S.J. Koleangan, dan M.R.J. Runtuwene. 2013. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT dan Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Soyogik (*Saurauia bracteosa* DC) dengan Metode Soxhletasi. *J. MIPA*. **2** (2): 115-118
- Muharni, Fitrya, Dan S. Farida. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Tanaman Obat Suku Musi di Kabupaten Musi Banyuasin, Sumatera Selatan. *Jurnal Kefarmasian Indonesia* **7** (2): 127-135
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, Dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*. **7** (2) 361-367
- Muliani, B. R. Tampangallo, dan M. Atmomarsono. 2016. Aktivitas Antibakteri Penyebab Vibriosis Terhadap Udang Windu Dari Ekstrak Herbal Mangrove *Sonneratia alba* Dan *Bruguiera gymnorrhiza*. *Jurnal Riset Akuakultur*. **11** (3): 281-289
- Mulyani, Y., E. bachtar, Dan M. U. Kurnia. 2013. Peranan Senyawa Metabolit Sekunder Tumbuhan Mangrove Terhadap Infeksi Bakteri *Aeromonas Hydrophila* Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.). *jurnal akuatika*. **4** (1): 1-9
- Musa, W.J.A., Suleman D., dan Rahmawati H.T. 2017. Senyawa Triterpenoid Dari Tumbuhan Mangrove (*Sonneratia alba*). *Jurnal ITEKIMA*. **1** (1): 36-45.
- Najib, A., A. Malik, A. R. Ahmad, V. Handayani, R. A. Syarif, Dan R. Waris. 2017. Standarisasi Ekstrak Air Daun Jati Belanda Dan Teh Hijau. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. **4** (2): 241-245
- Ningrum, R., E. Purwanti, dan Sukarsono. 2016. Identifikasi Senyawa Alkaloid Dari Batang Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa*) Sebagai Bahan Ajar Biologi Untuk SMA Kelas X. *Jurnal Pendidikan Biologi Indonesia*. **2** (3): 231-236
- Oratmangun, S. A., Fatimawali dan W. Bodhi. 2014. Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli* L.) terhadap *Artemia salina* dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) sebagai Studi Pendahuluan Potensi Anti Kanker. *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi*. **3** (3) : 316-324



- Pangestuti, I. K., Sumardianto, Dan U. Amalia. 2017. Skrining Senyawa Fitokimia Rumput Laut *Sargassum* Sp. Dan Aktivitasnya Sebagai Antibakteri Terhadap *Staphylococcus aureus* Dan *Eschericia coli*. Saintek Perikanan. **12** (2): 98-102
- Patel, Dharmendra. 2011. Matrix Effect In A View Of Lc-MS/MS: An Overview. International Journal Of Pharma And Bio Sciences. **2** (1): 559-564
- Pradana, D., D. Suryanto, dan Yunasfi. 2013. uji daya hambat ekstrak kulit batang *Rhizophora Mucronata* terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas Hydrophila*, *Streptococcus Agalactiae* dan jamur *Saprolegnia* Sp. secara in vitro. *J. Universitas Sumatera Utara*, 78-92
- Prastomo, R. H., R. Herawatiningsih, dan S. Latifah. 2017. Keanekaragaman Vegetasi Di Kawasan Hutan Mangrove Desa Nusapati Kabupaten Mempawah. *Jurnal Hutan Lestari*. **5** (2): 556 – 562.
- Prihanto, A. A., M. Firdaus, dan R. Nurdiani. 2011. Penapisan Fitokimia Dan Antibakteri Ekstrak Metanol Mangrove (*Excoecaria agallocha*) Dari Muara Sungai Porong. Berk. Penel. Hayati: 17: 69–72
- Prihantoro, T., R. Indra dan Sumarno. 2006. Efek Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Delima (*Punica granatum*) terhadap *Shigella dysenteriae* secara In Vitro. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. **22** (3): 101-106.
- Poeloengan, M dan Andriani. 2013. Kandungan Senyawa Aktif dan Daya Antibakteri Daun Sambung Darah. *Jurnal Veteriner*. **14** (2): 145-152
- Purnama, W. B., P. Indrayudha, dan R. Munawaroh. 2013. Aktivitas Antibakteri Glukosa Terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Bacillus Subtilis* Dan *Escherichia Coli*.
- Purwanto, R. S., H. M. Siregar, Sudarmono, dan A. Agusta. 2016. Potensi Antibakteri Ekstrak Daun Lasianthus Terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Jamu Indonesia*. **1** (3): 6-11
- Puspitasari, Dian. 2017. Aktivitas Antibakteri Dari Ekstrak Getah Mangrove *Excoecaria Agallocha* Pada Pelarut Kloroform Terhadap *Escherichia Coli* Dan *Staphylococcus Aureus*. *Acta Aquatica*, **4** (1): 1-3
- Putri, A. V. A. A., N Hafida, Dan V. Megawati. 2017. Pengaruh Daya Antibakteri Ekstrak Daun Stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) Pada Konsentrasi 5%, 10%, 20%, 40% Dan 80% Terhadap *Streptococcus mutans* (In Vitro). *jurnal ilmu kedokteran gigi*. **1** (1): 9-14
- Rafsanjani, M. K., Dan W. D. R. Putri. 2015. Karakterisasi Ekstrak Kulit Jeruk Bali Menggunakan Metode Ultrasonic Bath (Kajian Perbedaan Pelarut Dan Lama Ekstraksi). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. **3** (4): 1473-1480
- Rahayoe, S., B. Rahardjo dan R.S. Kusumandari. 2008. Konstanta Laju Pengeringan Daun Sambiloto menggunakan Pengering Tekanan Rendah. *Jurnal Rekayasa Proses*. **2** (1): 17-23.

- Rasyid, Abdullah. 2012. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Serta Uji Aktivitas Antibakteri Dan Antioksidan Ekstrak Metanol Teripang *Stichopus hermanii*. Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis. **4**, (2): 360-368
- Ratnani, R. D., I. Hartati, Y. Anas, D. Endah, Dan D. D. D. Khilyati. 2015. Standardisasi Spesifik Dan Non Spesifik Ekstraksi Hidrotropi Andrographolid Dari Sambiloto (*Andrographis paniculata*). 147-155
- Rohmah, R. N., N. I, Ratnaningtyas, Dan A. Asnani. 2014. Kajian Toksisitas Dari Tubuh Buah *Ganoderma lucidum* Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BST). Scripta Biologica. **1** (1): 30-32
- Rohyani, I. S., E. Aryanti, dan Suripto. 2015. Kandungan Fitokimia Beberapa Jenis Tumbuhan Lokal yang Sering Dimanfaatkan Sebagai Bahan Baku Obat di Pulau Lombok. Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon, **1**(2): 388-391.
- Romadanu., S. H. Rachmawati, Dan S. D. Lestari. 2014. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bunga Lotus (*Nelumbo nucifera*). **3** (1): 1-7
- Rumagit, H. M., M. R.J. Runtuwene, Dan S. Sudewi. 2015. Uji Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antioksidan Dari Ekstrak Etanol Spons *Lamellodysidea herbacea*. Jurnal Ilmiah Farmasi Unsrat. **4** (3): 183-192
- Sagala, S. 2006. Konsep dan Makna Belajar, Bandung: CV Alfabeta. 266 hlm.
- Sari, P. P., W. S. Rita, dan N. M. Puspawati. 2015. Identifikasi Dan Uji Aktivitas Senyawa Tanin Dari Ekstrak Daun Trembesi (*Samanea Saman* (Jacq.) Merr) Sebagai Antibakteri *Escherichia coli* (E. coli). Jurnal Kimia. **9** (1): 27-34
- Sartika, R., Melki dan A. I.S. Purwiyanto. 2013. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rumput Laut *Eucheuma cottoni* terhadap Bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholera* dan *Salmonella typhosa*. Maspatri Journal. **5** (2): 98-103
- Sarjono, P. R., N. S. Mulyani, dan N. Wulandari. 2012. Uji antibakteri kitosan dari kulit udang windu (*Panaeus monodon*) dengan metode difusi cakram kertas. *Proceeding Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia*.
- Sasmito, W. A., A. D. Wijayanti, I. Fitriana, dan P. W. Sari. 2015. Pengujian Toksisitas Akut Obat Herbal Pada Mencit Berdasarkan Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Jurnal Sain Veteriner. **33** (2): 234-298
- Satyan, RS., N. Aveek., P. Eganathan, A. Parida. 2009. Comparative Histochemical Localization of Secondary Metabolites in Seed-raised and In Vitro Propagated Plants of *Excoecaria agallocha* Linn. (Euphorbiaceae), The Milky Mangrove Tree of Historical Significance. *Biotechnic and Histochemistry* **85** (5) : 285-293



- Senja, R. Y., E. Issusilaningtyas, A. K. Nugroho, Dan E. P. Setyowati. 2014. Perbandingan Metode Ekstraksi Dan Variasi Pelarut Terhadap Rendemen Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kubis Ungu (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra*). Traditional Medicine Journal. **19** (1): 43-48
- Simaremare, Eva S. 2014. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Gatal (*Laportea decumana* (Roxb.) Wedd). *Pharmacy* **11** (1) : 98-107
- Siregar, A. F., A. Sabdono, dan D. Pringgenies. 2012. Potensi Antibakteri Ekstrak Rumput Laut Terhadap Bakteri Penyakit Kulit *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Micrococcus luteus*. Journal Of Marine Research. **1** (2): 152-160
- Soleha, T. U., 2015. Uji Kepekaan Terhadap Antibiotik. JuKe Unila. **5** (9): 119-123
- Suryani, Y., L. W. Sophia, T. Cahyanto, dan I. Kinasih. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Dan Antioksidan Infusum Cacing Tanah (*Lumbricus Rubellus*) Dengan Tambahan Kitosan Udang Pada *Salmonella Thypi*. **9** (2): 264-281
- Sudarno, F.A., Setiorini dan H. Suprpto. 2011. Efektifitas Ekstrak Tanaman Meniran (*Phyllanthus niruri*) sebagai Antibakteri *Edwardsiella tarda* secara *In Vitro*. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **3** (1): 103-108.
- Sugiyono. 2013. Statistika Untuk Penelitian. Alfabeta. Bandung. 390 hlm.
- Sukandar, D., Hermanto, S. dan Lestari, E. 2017. Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pandan Wangi ( *Pandanus amaryllifolius* Roxb.) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). UIN Syarif Hidayatullah. Jakarta. 63-70
- Suyono. Y. dan F. Salahudin. 2011. Identifikasi Dan Karakterisasi Bakteri *Pseudomonas* Pada Tanah Yang Terindikasi Terkontaminasi Logam. *Jurnal Biopropal Industri*. **2** (1): 8-13
- Syamsul, E. S., D. N. I. Sari, dan Supomo. 2015. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Kerehau (*Callicarpa Longifolia* Lam.) Terhadap Mencit Putih. *Jurnal Ilmiah Manuntung*. **1**(2): 127-132
- Tyas, N. M., D. T. F. L. Batu, Dan R. Affandi. 2016. Uji Toksisitas Letal Cr6+ Terhadap Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia (JIPI)*. **21** (2): 128-132
- Wiyanto, D. B. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rumput Laut *Kappaphycus Alvarezii* Dan *Eucheuma Denticullatum* Terhadap Bakteri *Aeromonas Hydrophila* Dan *Vibrio Harveyii* *Jurnal Kelautan*. **3** (1): 1-17
- Yulinery. T. dan N. Nurhidayat. 2015. Uji aktivitas antibakteri *Lactobacillus plantarum* terseleksi dari buah markisa (*Passiflora edulis*) dan kaitannya dengan genplantarisin A (plnA). **1** (2): 270-277

Zhang, Zhihong, Renchao Zhou, Tian Tang, Yelin Huang, Yang Zhong, Suhua Shi. 2008. Genetic Variaton in Central and Peripheral Populations of *Excoecaria agallocha* From Indo-West Pacific. *Aquatic Botany* **89** : 57-62



**Lampiran 1.** Data Hasil Perhitungan dan ANOVA (*Analysis of Variance*)  
Rendemen Ekstrak Kasar Daun Mangrove Menengan (*Excoecaria agallocha*)

Pelarut	Ulangan	Berat Sampel (g)	Berat Ekstrak (g)	Rendemen (%)	Rata-rata (%)
N heksan	1	150	3,2	2,13	1,97
	2	150	3	2,00	
	3	150	3,4	2,27	
	4	150	3,1	2,07	
	5	150	3,1	2,07	
	6	150	3	2,00	
Etil Asetat	1	149,7	4,9	3,27	2,38
	2	148,4	5,2	3,50	
	3	149,5	5,3	3,55	
	4	148,1	4,8	3,24	
	5	147,5	5,1	3,46	
	6	149	5	3,36	
Metanol	1	142,4	9,5	6,67	8,24
	2	143,8	9,9	6,88	
	3	144,3	10,4	7,21	
	4	142,5	11	7,72	
	5	141,6	10	7,06	
	6	144,4	10,8	7,48	

Perhitungan Rendemen

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak (g)}}{\text{berat sampel awal (g)}} \times 100\%$$

Contoh perhitungan ekstrak kasar daun mangrove menengan pada pelarut n-heksan ulangan 1

Pelarut N-heksan Ulangan 1

$$\% \text{ rendemen} = \frac{3,20 \text{ g}}{150 \text{ g}} \times 100\%$$

$$\% \text{ rendemen} = 2,13\%$$

Jadi rendemen pada ekstrak n-heksan ulangan 1 memiliki nilai sebesar 2,13%

- ANOVA (*Analysis of Variance*) Rendemen Ekstrak Daun Mangrove Menengan**

Data hasil penelitian dianalisis menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*) untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang dilakukan dengan uji F pada taraf 5%. Apabila  $F_{hitung} > F_{Tabel}$  maka dapat dilakukan uji lanjut, salah satunya menggunakan uji Tukey.

#### ANOVA

RENDEMEN						
	Sum of Squares	Df	Mean Square	Fhitung	F tabel (5%)	Sig.
Between Groups	77.958	2	38.979	129.396	3,68	.000
Within Groups	4.519	15	.301			
Total	82.477	17				

Bedasarkan tabel diatas dapat diketahui bahwa nilai  $F_{hitung}$  (129,396)  $>$   $F_{tabel}$  (3,68) maka perbedaan pelarut ekstraksi memberikan pengaruh yang nyata terhadap hasil rendemen ekstrak daun mangrove menengan.

#### RENDEMEN

##### Tukey HSD

PERLAKUA	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
N HEKSAN	6	2.0900		
ETIL	6		3.7300	
ASETAT	6			7.0900
METANOL	6			
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

**Lampiran 2.** Data, Hasil Perhitungan dan ANOVA (*Analysis of Variance*) Uji Kadar Air Ekstrak Kasar Daun Mangrove Menengan (*Excoecaria agallocha*)

Pelarut	Ulangan	Berat Sampel (g)	Berat Cawan (g)	Berat Akhir (g)	Kadar Air (%)	Rata-rata (%)	Standar deviasi
N heksan	1	1	19,92	20,74	18	18,83	1,47
	2	1	20,8	21,6	20		
	3	1	19,77	20,56	21		
	4	1	21,12	21,93	19		
	5	1	20,4	21,23	17		
	6	1	21,16	21,98	18		
Etil asetat	1	1	20,14	21	14	13,83	1,17
	2	1	20,76	21,61	15		
	3	1	27,43	28,3	13		
	4	1	29,12	30	12		
	5	1	28,84	29,7	14		
	6	1	30,5	31,35	15		
Metanol	1	1	28,6	29,52	8	7,67	0,52
	2	1	27,7	28,63	7		
	3	1	29,58	30,5	8		
	4	1	19,81	20,73	8		
	5	1	27,87	28,8	7		
	6	1	30,61	31,53	8		

Perhitungan Kadar Air

$$\% \text{ kadar air} = \frac{(A+B)-C}{B} \times 100\%$$

Keterangan:

A = berat botol timbang (g)

B = berat awal sampel (g)

C = berat akhir sampel (g)

Contoh perhitungan uji kadar air ekstrak daun mangrove menengan pada pelarut n-heksan ulangan 1

$$\% \text{ kadar air} = \frac{(19,92+1)-20,74}{1} \times 100\%$$

$$\% \text{ Kadar air} = 18\%$$

Jadi kadar air pada ekstrak n-heksan ulangan 1 memiliki nilai sebesar 18%.

- **ANOVA (*Analysis of Variance*) Rendemen Ekstrak Daun Mangrove Menengan**

Data hasil penelitian dilakukan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) pada taraf kepercayaan 95% untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang digunakan. Apabila  $F_{hitung} > F_{tabel}$  maka dilakukan uji lanjut, salah satunya dengan menggunakan uji Tukey.

ANOVA						
KADAR_AIR						
	Sum of Squares	df	Mean Square	Fhitung	Ftabel(5%)	Sig.
Between Groups	375.444	2	187.722	148.202	3.68	.000
Within Groups	19.000	15	1.267			
Total	394.444	17				

Bedasarkan tabel diatas dapat diketahui bahwa nilai  $F_{hitung}$  (148.202) >  $F_{tabel}$  (3,68) maka perbedaan pelarut ekstraksi memberikan pengaruh yang nyata terhadap hasil rendemen ekstrak daun mangrove menengan.

#### KADAR\_AIR

Tukey HSD

PERLAKUAN	N	Subset		
		1	2	3
METANOL	6	7.6667		
ETIL	6		13.8333	
ASETAT	6			18.8333
N HEKSAN	6			
Sig.		1.000	1.000	1.000



### Lampiran 3. Perhitungan Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji Toksisitas

$$1 \text{ ppm} = \frac{1 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}}$$

- **Larutan Induk (Konsentrasi 20.000 ppm)**

$$\begin{aligned} 20.000 \text{ ppm} &= 20 \text{ mg} + 1 \text{ ml air laut} \\ &= 400 \text{ mg} + 20 \text{ ml} \\ &= 0,4 \text{ gr} + 20 \text{ ml} \end{aligned}$$

Ekstrak kasar sebanyak 0,4 gram ditambahkan air laut hingga mencapai volume 20 ml dan dihasilkan larutan induk dengan konsentrasi sebesar 20.000 ppm.

- **Larutan Esktrak (Konsentrasi 10.000 ppm)**

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$20.000 \times V_1 = 10.000 \times 10$$

$$V_1 = 5 \text{ ml}$$

Diambil 5 ml dari larutan induk 20.000 ppm kemudian ditambahkan air laut hingga mencapai 10 ml dan dihasilkan larutan ekstrak dengan konsentrasi 10.000 ppm.

- **Larutan Esktrak (Konsentrasi 7.500 ppm)**

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$20.000 \times V_1 = 7.500 \times 10$$

$$V_1 = 3,75 \text{ ml}$$

Diambil 3,75 ml dari larutan induk 20.000 ppm kemudian ditambahkan air laut hingga mencapai 10 ml dan dihasilkan larutan ekstrak dengan konsentrasi 7.500 ppm.

- **Larutan Esktrak (Konsentrasi 5.000 ppm)**

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$20.000 \times V_1 = 5.000 \times 10$$

$$V_1 = 2,5 \text{ ml}$$

Diambil 2,5 ml dari larutan induk 20.000 ppm kemudian ditambahkan air laut hingga mencapai 10 ml dan dihasilkan larutan ekstrak dengan konsentrasi 5.000 ppm.

- **Larutan Esktrak (Konsentrasi 2.500 ppm)**

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$20.000 \times V_1 = 2.500 \times 10$$

$$V_1 = 1,25 \text{ ml}$$

Diambil 1,25 ml dari larutan induk 20.000 ppm kemudian ditambahkan air laut hingga mencapai 10 ml dan dihasilkan larutan ekstrak dengan konsentrasi 2.500 ppm.

ppm.

- **Larutan Esktrak (Konsentrasi 0 ppm)**

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$200.000 \times V_1 = 0 \times 10$$

$$V_1 = 0 \text{ ml}$$

Ditambahkan 5 mL DMSO 10% dan dihasilkan larutan ekstrak dengan konsentrasi 0 ppm yang digunakan sebagai kontrol.



**Lampiran 4. Data Hasil Perhitungan dan ANOVA (*Analysis of Variance*) Uji Toksisitas Ekstrak Kasar Daun Mangrove Menengan (*Excoecaria agallocha*)**

Data Hasil Perhitungan Uji Toksisitas Ekstrak Kasar Daun Mangrove Menengan

Pelarut	Ulangan	Mortalitas (%)					LC50	Rata-Rata
		10.000 ppm	7.500 ppm	5.000 ppm	2.500 ppm	0 ppm (Kontrol)		
N heksan	1	70	60	60	50	0	3697,76	3869,332
	2	80	60	50	50	0	3571,33	
	3	70	60	40	40	0	3549,18	
	4	70	60	50	50	0	4079,63	
	5	80	70	40	30	0	4264,03	
	6	70	60	60	40	0	4054,06	
Etil asetat	1	90	90	80	60	0	1717,88	1583,408
	2	80	70	50	50	0	1552,27	
	3	90	90	80	60	0	1467,13	
	4	90	80	60	50	0	1552,57	
	5	80	80	60	50	0	1717,88	
	6	90	70	60	50	0	1492,71	
Metanol	1	100	100	80	80	0	817,85	825,0925
	2	100	90	70	70	0	888,42	
	3	100	90	90	70	0	731,95	
	4	100	100	90	90	0	916,93	
	5	100	90	80	80	0	753,23	
	6	100	100	90	70	0	842,18	

• Uji Toksisitas Ekstrak Pelarut N-Heksan

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Jumlah <i>Artemia</i> yang mati					
		1	2	3	4	5	6
Ekstrak N-Heksan	0	0	0	0	0	0	0
	2500	5	5	4	5	3	4
	5000	6	5	4	5	4	6
	7500	6	6	6	6	7	6
	10000	7	8	7	7	8	7

**Ulangan 1**

Konsentrasi	Larva Mati	% Mortalitas	Log kons	% probit	persamaan regresi	R2	LC50 (ppm)
-------------	------------	--------------	----------	----------	-------------------	----	------------

10000	7	70	4	5,52	$y = 1,3917x - 0,0345$	0,9955	3697,76
7500	6	60	3,88	5,25			
5000	6	60	3,70	5,25			
2500	5	50	3,40	5,00			
0	0	0	0	0			

## Ulangan 2

Konsentrasi	Larva Mati	% Mortalitas	Log kons	% probit	persamaan regresi	R2	LC50 (ppm)
10000	8	80	4	5,84	$y = 1,4044x + 0,0104$	0,9922	3571,33
7500	6	60	3,88	5,25			
5000	5	50	3,70	5,00			
2500	5	50	3,40	5,00			
0	0	0	0	0			

## Ulangan 3

Konsentrasi	Larva Mati	% Mortalitas	Log kons	% probit	persamaan regresi	R2	LC50 (ppm)
10000	6	60	4	5,25	$y = 1,3437x + 0,0242$	0,9977	3549,18
7500	6	60	3,88	5,25			
5000	5	50	3,70	5,00			
2500	4	40	3,40	4,75			
0	0	0	0	0			

## Ulangan 4

Konsentrasi	Larva Mati	% Mortalitas	Log kons	% probit	persamaan regresi	R2	LC50 (ppm)
10000	7	70	4	5,52	$y = 1,3763x + 0,0307$	0,9947	4079,62
7500	6	60	3,88	5,25			
5000	5	50	3,70	5,00			
2500	5	50	3,40	5,00			
0	0	0	0	0			

## Ulangan 5

Konsentrasi	Larva Mati	% Mortalitas	Log kons	% probit	persamaan regresi	R2	LC50 (ppm)
10000	8	80	4	5,84	$y = 1,3915x - 0,0509$	0,9867	4264,03
7500	7	70	3,88	5,52			
5000	4	40	3,70	4,75			
2500	3	30	3,40	4,48			
0	0	0	0	0			

## Ulangan 6

Konsentrasi	Larva Mati	% Mortalitas	Log kons	% probit	persamaan regresi	R2	LC50 (ppm)
-------------	------------	--------------	----------	----------	-------------------	----	------------

10000	7	70	4	5,52	$y = 1,3828x + 0,011$	0,9985	4054,06
7500	6	60	3,88	5,25			
5000	6	60	3,70	5,25			
2500	4	40	3,40	4,75			
0	0	0	0	0			

Contoh perhitungan data toksisitas ekstrak kasar daun menengan (*Excoecaria agallocha*) dengan pelarut n-heksan ulangan 6, langkah pertama menghitung % mortalitas (kematian) larva *Artemia* dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{mortalitas} = \frac{\text{Jumlah larva mati}}{\text{jumlah larva}}$$

$$0 \text{ ppm} = \frac{0}{10} \times 100 = 0\% \quad 7500 \text{ ppm} = \frac{4}{10} \times 100 = 40\%$$

$$2500 \text{ ppm} = \frac{4}{10} \times 100 = 40\% \quad 10000 \text{ ppm} = \frac{5}{10} \times 100 = 50\%$$

$$5000 \text{ ppm} = \frac{3}{10} \times 100 = 30\%$$

Setelah itu, variasi konsentrasi yang digunakan antara lain 0; 2500; 5000; 7500; dan 10000 ppm dilogaritma sebagai berikut:

$$\text{Log } 0 = 0 \quad \text{Log } 7500 = 3,88$$

$$\text{Log } 2500 = 3,40 \quad \text{Log } 10000 = 4,00$$

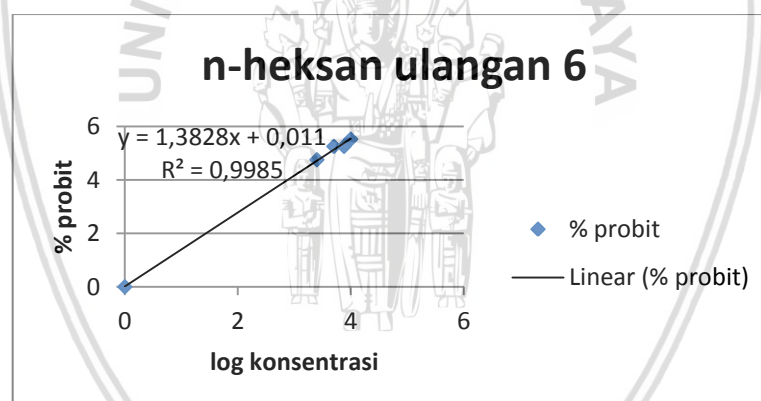
$$\text{Log } 5000 = 3,70$$

Langkah selanjutnya yaitu menentukan nilai % probit dengan melihat tabel probit persentase mortalitas dibawah ini:

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.5	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.83	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23

60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
%	0.0	0.1	0.26	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

Kemudian data yang diperoleh dari log konsentrasi dan %probit dimasukkan ke dalam aplikasi *Microsoft excel* sehingga didapatkan persamaan pada grafik sebagai berikut:



Berdasarkan grafik diatas diperoleh persamaan  $y = 1,3828x + 0,011$

Kemudian dimasukkan nilai probit 5 (50% kematian) ke dalam persamaan tersebut untuk menghasilkan nilai  $LC_{50}$  (konsentrasi sampel yang mampu menyebabkan sebanyak 50% hewan uji mati).

$$y = 1,3828x + 0,011$$

$$5 = 1,3828x + 0,011$$

$$x = \frac{5-0,011}{1,3828}$$

$$x = 3,5363$$



anti log 3,5363 = 4054,06 ppm

LC<sub>50</sub> = 4054,06 ppm

### Uji toksisitas pelarut etil asetat

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Jumlah <i>Artemia</i> yang mati					
		1	2	3	4	5	6
Ekstrak N-Heksan	0	0	0	0	0	0	0
	2500	6	5	6	5	5	5
	5000	8	5	8	6	6	6
	7500	9	7	9	8	8	7
	10000	9	8	9	9	8	9

### Ulangan 1

Konsentrasi	Larva Mati	% Mortalitas	Log kons	% probit	persamaan regresi	R <sup>2</sup>	LC50 (ppm)
10000	9	90	4	6,28	$y = 1,5392x - 0,0207$	0,9947	1717,88
7500	8	80	3,88	5,84			
5000	7	70	3,70	5,52			
2500	7	70	3,40	5,52			
0	0	0	0	0			

### Ulangan 2

Konsentrasi	Larva Mati	% Mortalitas	Log kons	% probit	persamaan regresi	R <sup>2</sup>	LC50 (ppm)
10000	9	90	4	6,28	$y = 1,5589x + 0,0256$	0,9926	1552,27
7500	8	80	3,88	5,84			
5000	8	80	3,70	5,84			
2500	7	70	3,40	5,52			
0	0	0	0	0			

### Ulangan 3

Konsentrasi	Larva Mati	% Mortalitas	Log kons	% probit	persamaan regresi	R <sup>2</sup>	LC50 (ppm)
10000	9	90	4	6,28	$y = 1,5834x - 0,0138$	0,9987	1467,13
7500	9	90	3,88	6,28			
5000	8	80	3,70	5,84			
2500	6	60	3,40	5,25			

0	0	0	0	0			
---	---	---	---	---	--	--	--

**Ulangan 4**

Konsentrasi	Larva Mati	% Mortalitas	Log kons	% probit	persamaan regresi	R2	LC50 (ppm)
10000	9	90	4	6,28	$y = 1,5589x - 0,0256$	0,9966	1552,57
7500	8	80	3,88	5,84			
5000	8	80	3,70	5,84			
2500	7	70	3,40	5,52			
0	0	0	0	0			

**Ulangan 5**

Konsentrasi	Larva Mati	% Mortalitas	Log kons	% probit	persamaan regresi	R2	LC50 (ppm)
10000	9	90	4	6,28	$y = 1,5392x + 0,0207$	0,9947	1717,88
7500	8	80	3,88	5,84			
5000	7	70	3,70	5,52			
2500	7	70	3,40	5,52			
0	0	0	0	0			

**Ulangan 6**

Konsentrasi	Larva Mati	% Mortalitas	Log kons	% probit	persamaan regresi	R2	LC50 (ppm)
10000	9	90	4	6,28	$y = 1,5732x - 0,0067$	0,9947	1492,71
7500	9	90	3,88	6,28			
5000	7	70	3,70	5,52			
2500	7	70	3,40	5,52			
0	0	0	0	0			

Contoh perhitungan data toksisitas ekstrak kasar daun menengan (*Excoecaria agallocha*) dengan pelarut etil asetat ulangan 6, langkah pertama menghitung % mortalitas (kematian) larva *Artemia* dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{mortalitas} = \frac{\text{jumlah larva mati}}{\text{jumlah larva}}$$

$$0 \text{ ppm} = \frac{0}{10} \times 100 = 0\% \quad 7500 \text{ ppm} = \frac{4}{10} \times 100 = 40\%$$


$$2500 \text{ ppm} = \frac{4}{10} \times 100 = 40\% \quad 10000 \text{ ppm} = \frac{5}{10} \times 100 = 50\%$$

$$5000 \text{ ppm} = \frac{3}{10} \times 100 = 30\%$$

Setelah itu, variasi konsentrasi yang digunakan antara lain 0; 2500; 5000; 7500; dan 10000 ppm dilogaritma sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{Log } 0 &= 0 & \text{Log } 7500 &= 3,88 \\ \text{Log } 2500 &= 3,40 & \text{Log } 10000 &= 4,00 \\ \text{Log } 5000 &= 3,70 \end{aligned}$$

Langkah selanjutnya yaitu menentukan nilai % probit dengan melihat tabel probit persentase mortalitas dibawah ini:

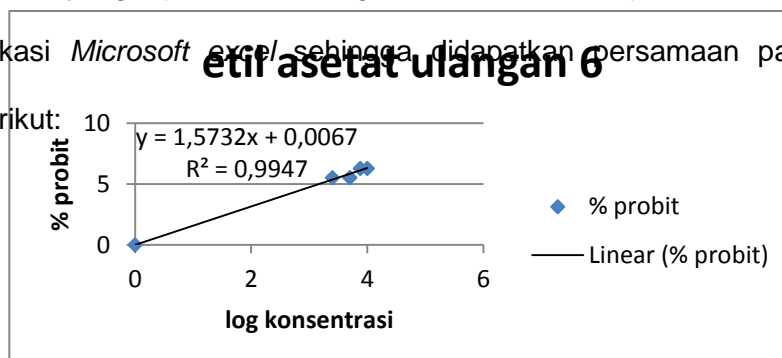


%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.5	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.83	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
%	0.0	0.1	0.26	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9

99 7.33 7.37 7.41 7.46 7.51 7.58 7.65 7.75 7.88 8.09

Kemudian data yang diperoleh dari log konsentrasi dan %probit dimasukkan ke dalam aplikasi *Microsoft excel* sehingga didapatkan persamaan pada grafik

sebagai berikut:



Berdasarkan grafik diatas diperoleh persamaan  $y = 1,5732x + 0,0067$

Kemudian dimasukkan nilai probit 5 (50% kematian) ke dalam persamaan tersebut untuk menghasilkan nilai  $LC_{50}$  (konsentrasi sampel yang mampu menyebabkan sebanyak 50% hewan uji mati).

$$y = 1,5732x + 0,0067$$

$$5 = 1,5732x + 0,0067$$

$$x = \frac{5 - 0,0067}{1,5732}$$

$$x = 3,1739$$

$$\text{anti log } 3,1739 = 1429,71 \text{ ppm}$$

$$LC_{50} = 1429,71 \text{ ppm}$$

### Uji toksisitas metanol

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Jumlah <i>Artemia</i> yang mati					
		1	2	3	4	5	6
Ekstrak N-Heksan	0	0	0	0	0	0	0
	2500	8	7	7	9	8	7

5000	8	7	9	9	8	9
7500	10	9	9	10	9	10
10000	10	10	10	10	10	10

**Ulangan 1**

Konsentrasi	Larva Mati	% Mortalitas	Log kons	% probit	persamaan regresi	R2	LC50 (ppm)
10000	10	100	4	8,09	$y = 1,752x - 0,103$	0,9463	817,85
7500	9	90	3,88	6,28			
5000	8	80	3,70	5,84			
2500	7	70	3,40	5,52			
0	0	0	0	0			

**Ulangan 2**

Konsentrasi	Larva Mati	% Mortalitas	Log kons	% probit	persamaan regresi	R2	LC50 (ppm)
10000	10	100	4	8,09	$y = 1,7323x - 0,1079$	0,9343	888,42
7500	9	90	3,88	6,28			
5000	7	70	3,70	5,52			
2500	7	70	3,40	5,52			
0	0	0	0	0			

**Ulangan 3**

Konsentrasi	Larva Mati	% Mortalitas	Log kons	% probit	persamaan regresi	R2	LC50 (ppm)
10000	10	100	4	8,09	$y = 1,7791x - 0,0962$	0,9561	731,95
7500	9	90	3,88	6,28			
5000	9	90	3,70	6,28			
2500	7	70	3,40	5,52			
0	0	0	0	0			

**Ulangan 4**

Konsentrasi	Larva Mati	% Mortalitas	Log kons	% probit	persamaan regresi	R2	LC50 (ppm)
10000	10	100	4	8,09	$y = 1,7179x - 0,089$	0,9311	916,93
7500	8	80	3,88	5,84			

5000	8	80	3,70	5,84			
2500	7	70	3,40	5,52			
0	0	0	0	0			

### Ulangan 5

Konsentrasi	Larva Mati	% Mortalitas	Log kons	% probit	persamaan regresi	R2	LC50 (ppm)
10000	10	100	4	8,09	$y = 1,7633x - 0,0729$	0,9503	753,23
7500	9	90	3,88	6,28			
5000	8	80	3,70	5,84			
2500	8	80	3,40	5,84			
0	0	0	0	0			

### Ulangan 6

Konsentrasi	Larva Mati	% Mortalitas	Log kons	% probit	persamaan regresi	R2	LC50 (ppm)
10000	10	100	4	8,09	$y = 1,7293x - 0,0589$	0,9336	842,18
7500	8	80	3,88	5,84			
5000	8	80	3,70	5,84			
2500	8	80	3,40	5,84			
0	0	0	0	0			

Contoh perhitungan data toksisitas ekstrak kasar daun mangrove *Excoecaria*

*Agallocha* dengan pelarut etil asetat ulangan 6, langkah pertama menghitung % mortalitas (kematian) larva *Artemia* dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{mortalitas} = \frac{\text{Jumlah larva mati}}{\text{jumlah larva}}$$

$$0 \text{ ppm} = \frac{0}{10} \times 100 = 0\% \quad 7500 \text{ ppm} = \frac{4}{10} \times 100 = 40\%$$

$$2500 \text{ ppm} = \frac{4}{10} \times 100 = 40\% \quad 10000 \text{ ppm} = \frac{5}{10} \times 100 = 50\%$$

$$5000 \text{ ppm} = \frac{3}{10} \times 100 = 30\%$$

Setelah itu, variasi konsentrasi yang digunakan antara lain 0; 2500; 5000; 7500; dan 10000 ppm dilogaritma sebagai berikut:

$$\text{Log } 0 = 0$$

$$\text{Log } 7500 = 3,88$$

$$\text{Log } 2500 = 3,40$$

$$\text{Log } 10000 = 4,00$$

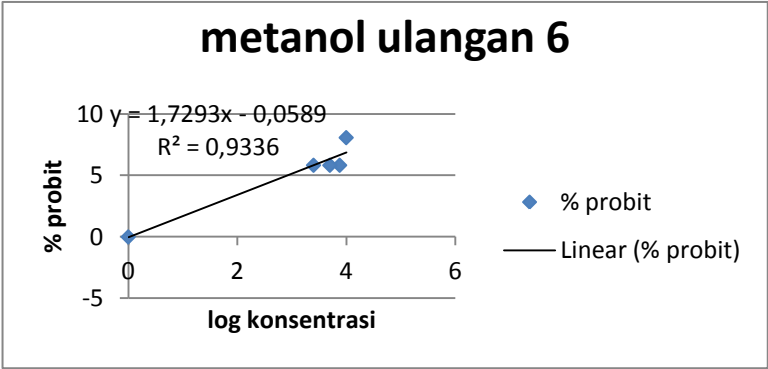
$$\text{Log } 5000 = 3,70$$



Langkah selanjutnya yaitu menentukan nilai % probit dengan melihat tabel probit persentase mortalitas dibawah ini:

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.5	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.83	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
%	0.0	0.1	0.26	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

Kemudian data yang diperoleh dari log konsentrasi dan %probit dimasukkan ke dalam aplikasi *Microsoft excel* sehingga didapatkan persamaan pada grafik sebagai berikut:



Berdasarkan grafik diatas diperoleh persamaan  $y = 1,7293x + 0,0589$

Kemudian dimasukkan nilai probit 5 (50% kematian) ke dalam persamaan tersebut untuk menghasilkan nilai  $LC_{50}$  (konsentrasi sampel yang mampu menyebabkan sebanyak 50% hewan uji mati).

$$y = 1,7293x + 0,0589$$

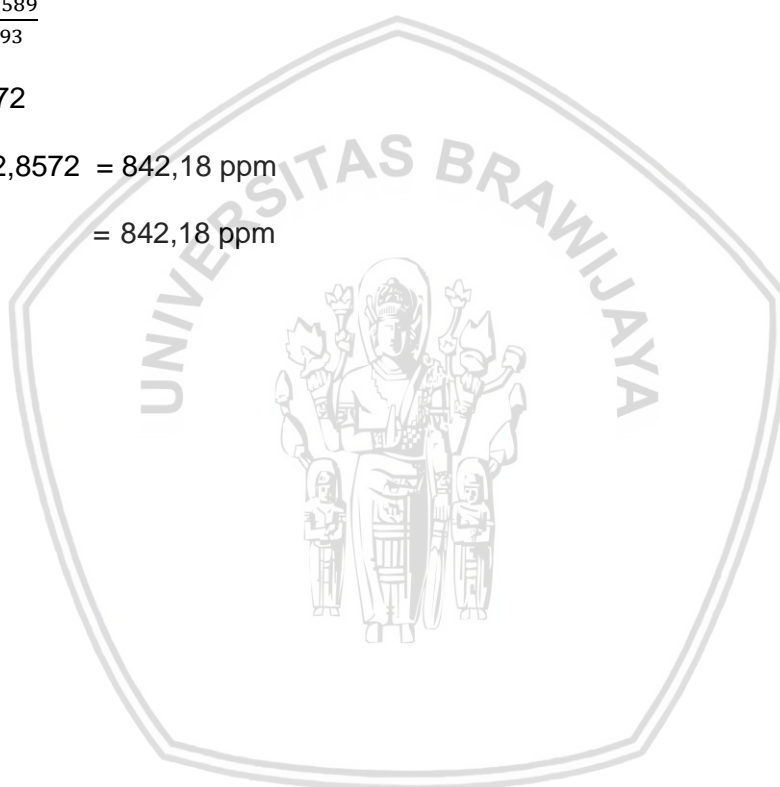
$$5 = 1,7293x + 0,0589$$

$$x = \frac{5 - 0,0589}{1,7293}$$

$$x = 2,8572$$

$$\text{anti log } 2,8572 = 842,18 \text{ ppm}$$

$$LC_{50} = 842,18 \text{ ppm}$$



**Lampiran 5.** Perhitungan Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji Antibakteri Ekstrak Kasar Daun Mangrove *Excoecaria agallocha*

$$1 \text{ ppm} = \frac{1 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}}$$

- **Larutan Induk (Konsentrasi 20.000 ppm)**

$$\begin{aligned} 200.000 \text{ ppm} &= 200 \text{ mg} + 1 \text{ ml air laut} \\ &= 2000 \text{ mg} + 20 \text{ ml} \\ &= 2 \text{ gr} + 20 \text{ ml} \end{aligned}$$

Ekstrak kasar sebanyak 0,4 gram ditambahkan air laut hingga mencapai volume 20 ml dan dihasilkan larutan induk dengan konsentrasi sebesar 20.000 ppm.

- **Larutan Esktrak (Konsentrasi 10.000 ppm)**

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$200.000 \times V_1 = 100.000 \times 10$$

$$V_1 = 5 \text{ ml}$$

Diambil 5 ml dari larutan induk 200.000 ppm kemudian ditambahkan air laut hingga mencapai 10 ml dan dihasilkan larutan ekstrak dengan konsentrasi 100.000 ppm.

- **Larutan Esktrak (Konsentrasi 7.500 ppm)**

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$200.000 \times V_1 = 75.000 \times 10$$

$$V_1 = 3,75 \text{ ml}$$

Diambil 3,75 ml dari larutan induk 200.000 ppm kemudian ditambahkan air laut hingga mencapai 10 ml dan dihasilkan larutan ekstrak dengan konsentrasi 75.000 ppm.

- **Larutan Esktrak (Konsentrasi 5.000 ppm)**

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$200.000 \times V_1 = 50.000 \times 10$$

$$V_1 = 2,5 \text{ ml}$$

Diambil 2,5 ml dari larutan induk 200.000 ppm kemudian ditambahkan air laut hingga mencapai 10 ml dan dihasilkan larutan ekstrak dengan konsentrasi 50.000 ppm.

- **Larutan Esktrak (Konsentrasi 2.500 ppm)**

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$200.000 \times V_1 = 25.000 \times 10$$

$$V_1 = 1,25 \text{ ml}$$

Diambil 1,25 ml dari larutan induk 200.000 ppm kemudian ditambahkan air laut hingga mencapai 10 ml dan dihasilkan larutan ekstrak dengan konsentrasi 25.000 ppm.

- **Larutan Esktrak (Konsentrasi 0 ppm)**

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$200.000 \times V_1 = 0 \times 10$$

$$V_1 = 0 \text{ ml}$$

Ditambahkan 5 mL DMSO 10% dan dihasilkan larutan ekstrak dengan konsentrasi 0 ppm yang digunakan sebagai kontrol.

- **ANOVA (*Analysis of Variance*) Uji Toksisitas Ekstrak Kasar Daun Mangrove Menengan**

ANOVA						
TOKSISITAS						
	Sum of Squares	df	Mean Square	Fhitung	Ftabel(5%)	Sig.
Between Groups	3.014E7	2	1.507E7	417.518	3.68	.000
Within Groups	541337.015	15	36089.134			
Total	3.068E7	17				

Berdasarkan tabel diatas didapatkan nilai  $F_{hitung}$  dari pelarut lebih besar dari  $F_{tabel}$  yaitu  $F_{hitung} (417.518) > F_{tabel} (3,68)$  . Apabila  $F_{hitung} > F_{tabel}$  maka perlakuan perbedaan pelarut memberikan pengaruh yang nyata terhadap nilai toksisitas. Kemudian dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji Tukey.

TOKSISITAS

Tukey HSD

PERLAKUAN	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
METANOL	6	8.2509E2		
ETIL ASETAT	6		1.5834E3	
N HEKSAN	6			3.8693E3
Sig.		1.000	1.000	1.000



**Lampiran 6.** Data Hasil Perhitungan dan ANOVA (*Analysis of Variance*) Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Daun Mangrove Menengan Metode Difusi

• **ANOVA Diameter Zona Hambat Bakteri *Bacillus cereus***

**ANOVA**

**ZONA\_HAMBATBACILUS**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F <sub>hitung</sub>	F <sub>tabel(5%)</sub>	Sig.
Between Groups	2404.448	5	480.890	408.096	2.53	.000
Within Groups	35.351	30	1.178			
Total	2439.799	35				

Berdasarkan tabel diatas didapatkan nilai  $F_{hitung}$  (408.096) dari pelarut lebih besar dari  $F_{tabel}$  (2.53). Apabila  $F_{hitung} > F_{tabel}$  maka perlakuan perbedaan pelarut memberikan pengaruh yang nyata terhadap nilai diameter daya hambat. Kemudian dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji Tukey.

**ZONA\_HAMBATBACILUS**

**Tukey HSD**

KONSENTRASI	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0	6	.0000					
25.000	6		7.9750				
50.000	6			12.1833			
75.000	6				15.2500		
100.000	6					18.0917	
KLORAMFENIKOL	6						26.2417
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



• ANOVA Diameter Zona Hambat Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

ANOVA

ZONA\_HAMBATPSEUDOMONAS

	Sum of Squares	df	Mean Square	Fhitung	Ftabel(5%)	Sig.
Between Groups	2145.966	5	429.193	1.444E3	3.53	.000
Within Groups	8.916	30	.297			
Total	2154.882	35				

Berdasarkan tabel diatas didapatkan nilai  $F_{hitung}$  (1.444E3) dari pelarut lebih besar dari  $F_{tabel}$  (2.53). Apabila  $F_{hitung} > F_{tabel}$  maka perlakuan perbedaan pelarut memberikan pengaruh yang nyata terhadap nilai diameter daya hambat. Kemudian dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji Tukey.

ZONA\_HAMBATPSEUDOMONAS

Tukey HSD

KONSENTRASI	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0	6	.0000					
25.000	6		5.8750				
50.000	6			9.0667			
75.000	6				12.1000		
100.000	6					15.0917	
KLORAMFENIKOL	6						24.7417
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

**Lampiran 7.** Data Hasil Uji MIC MBC Ekstrak Kasar Daun Mangrove Menengan Terhadap Bakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa*

• **MIC dan MIC Bakteri *Bacillus cereus***

Perlakuan	Diameter Zona Hambat (mm)						Total	Rata-rata	standar deviasi	Ln konsentrasi	kuadrat zona hambat
	1	2	3	4	5	6					
100.000	18,75	18,35	17,85	18,05	18,05	17,50	108,55	18,09	0,43	11,51	327,31
75.000	15,50	14,95	15,05	14,65	15,85	15,50	91,50	15,25	0,44	11,23	232,56
50.000	12,85	11,55	12,50	11,20	12,05	12,95	73,10	12,18	0,71	10,82	148,43
25.000	8,40	8,15	7,25	8,30	7,70	8,05	47,85	7,98	0,43	10,13	63,60
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Kloramfenikol	24,05	25,80	25,05	25,75	25,75	31,05	157,45	26,24	2,45		

$$y = 19,532x - 16,268$$

Jika  $Y=0$ , maka  $X=0,833$

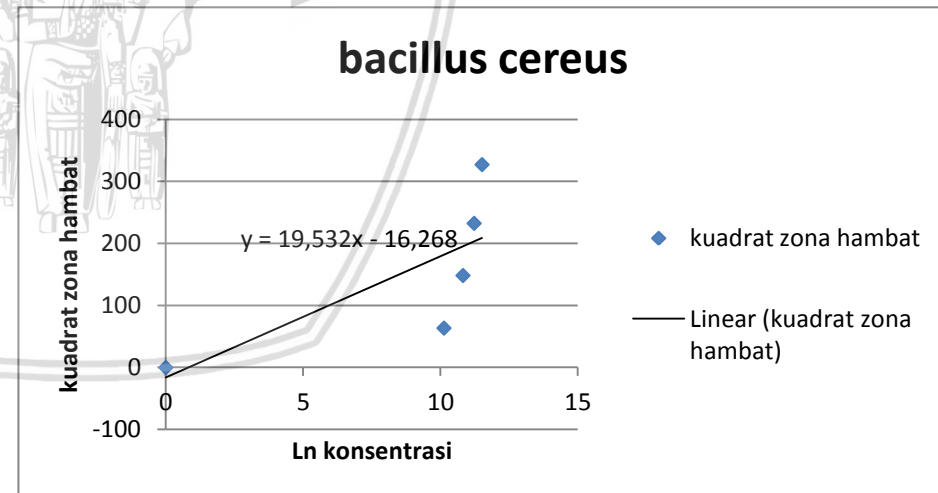
Nilai Konsentrasi ekstrak =  $\text{EXP}(0.833) = 2.30$  (eMt)

$\text{MIC} = \text{eMt} \times 0.25$

0,58

$\text{MBC} = \text{MIC} \times 4$

2,30



• MIC dan MIC Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Perlakuan	Diameter Zona Hambat (mm)						Total	Rata-rata	Standar Deviasi	Ln konsentrasi	kuadrat zona hambat
	1	2	3	4	5	6					
100.000	15,10	15,35	14,85	15,15	15,60	14,50	90,55	15,09	0,38	11,51	227,76
75.000	11,25	12,75	12,40	12,05	11,95	12,20	72,60	12,10	0,50	11,23	146,41
50.000	9,50	8,55	8,30	9,45	9,05	9,55	54,40	9,07	0,53	10,82	82,20
25.000	6,25	6,35	5,05	5,85	5,10	6,65	35,25	5,88	0,67	10,13	34,52
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Kloramfenikol	24,10	26,05	24,10	24,05	25,10	25,05	148,45	24,74	0,80		

$$y = 12,598x - 11,894$$

Jika  $Y=0$ , maka  $X=0,944$

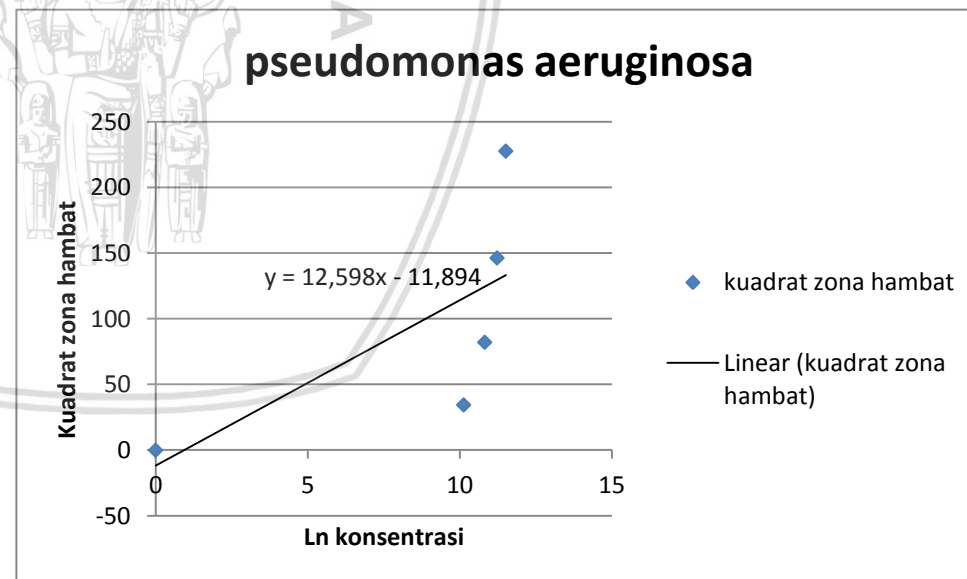
Nilai Konsentrasi ekstrak =  $\text{EXP}(0.944) = 2.57$  (eMt)

MIC = eMt x 0.25

0,64

MBC = MIC x 4

2,57



## Lampiran 8. Dokumentasi Penelitian

### • Ekstraksi Sampel



1. Penimbangan sampel



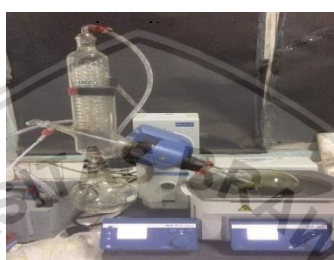
2. Penambahan pelarut



3. Proses maserasi selama 24 jam



4. Penyaringan



5. Proses evaporasi

### • Uji Kadar Air



1. Pengukuran berat botol timbang



2. Pengukuran berat awal ekstrak



3. Pengovenan



4. Pengkondisian sisa uap dalam desikator



5. Pengukuran berat akhir sampel

- Uji Fitokimia



3. Uji Alkaloid



2. Uji Flavonoid



1. Uji Steroid dan Triterpenoid



5. Uji Saponin



4. Uji Tanin

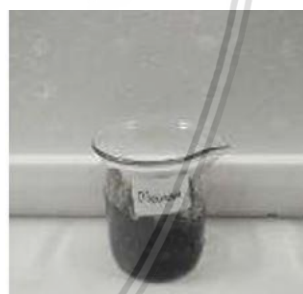
- Uji Toksisitas



1. Penetasan Larva Artemia



2. Penimbangan ekstrak



3. Pembuatan larutan stok



4. Pembuatan konsentrasi ekstrak



5. Masing-masing botol ditambahkan larva artemia 10 ekor



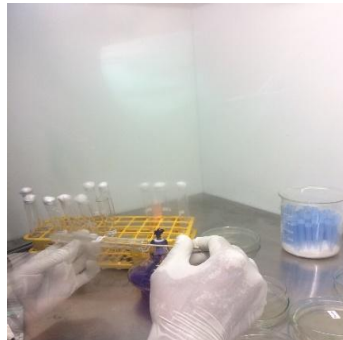
6. Diamati kematian Larva Artemia setelah 24 jam



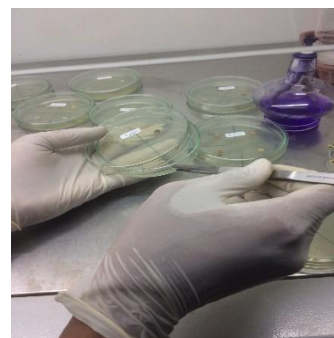
- Uji Aktivitas Antibakteri



1. Kertas cakram direndam dalam masing-masing konsentrasi ekstrak



2. Diambil 0,2 ml suspensi bakteri dan diratakan dengan batang sebar



3. Kertas cakram diletakkan diatas media



4. Diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam

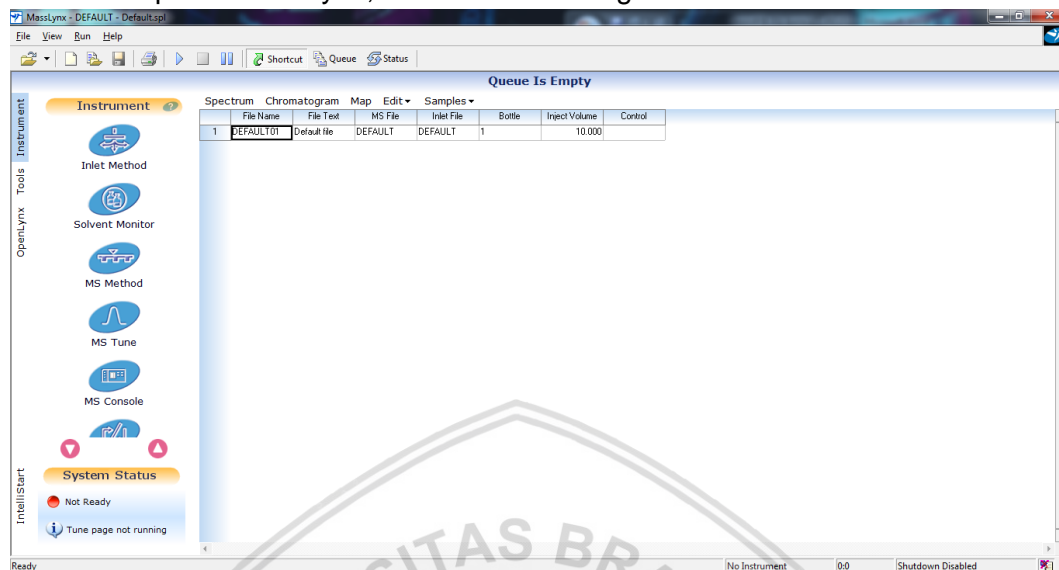


5. Diukur diameter zona hambat menggunakan jangka sorong

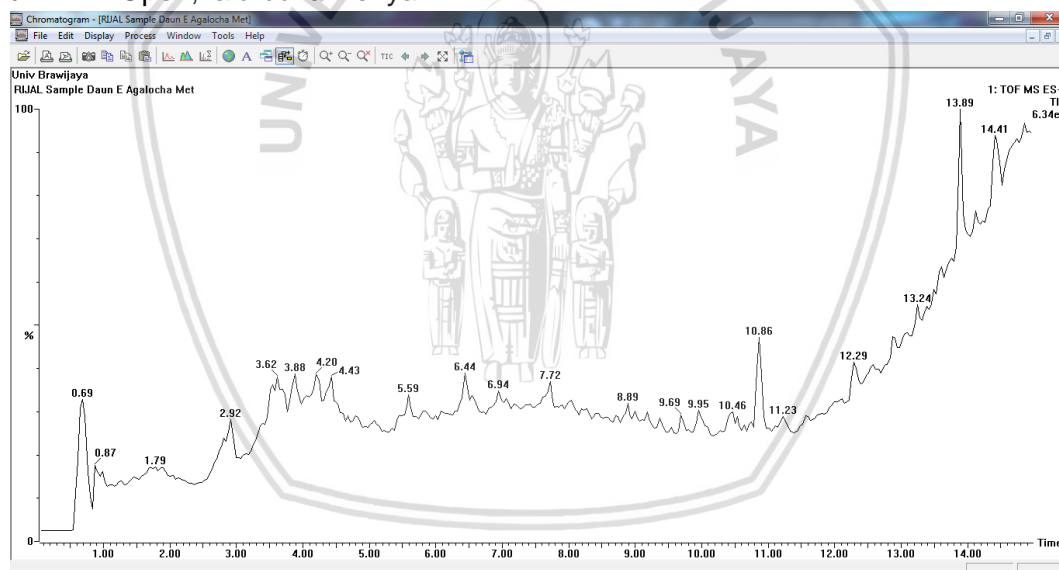


## Lampiran 9. Pengujian LCMS

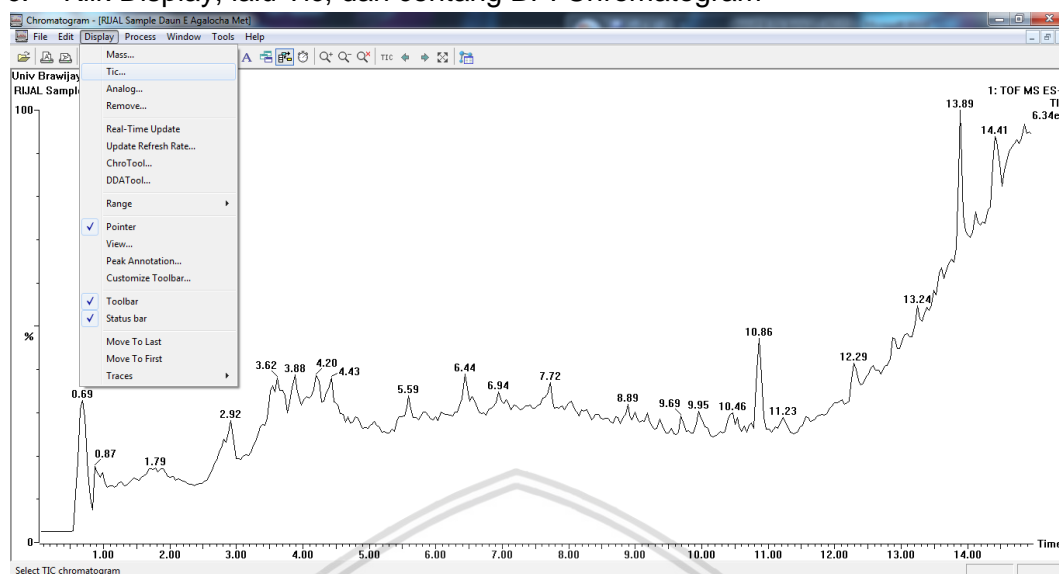
a. Buka aplikasi Masslynx, lalu klik Chromatogram



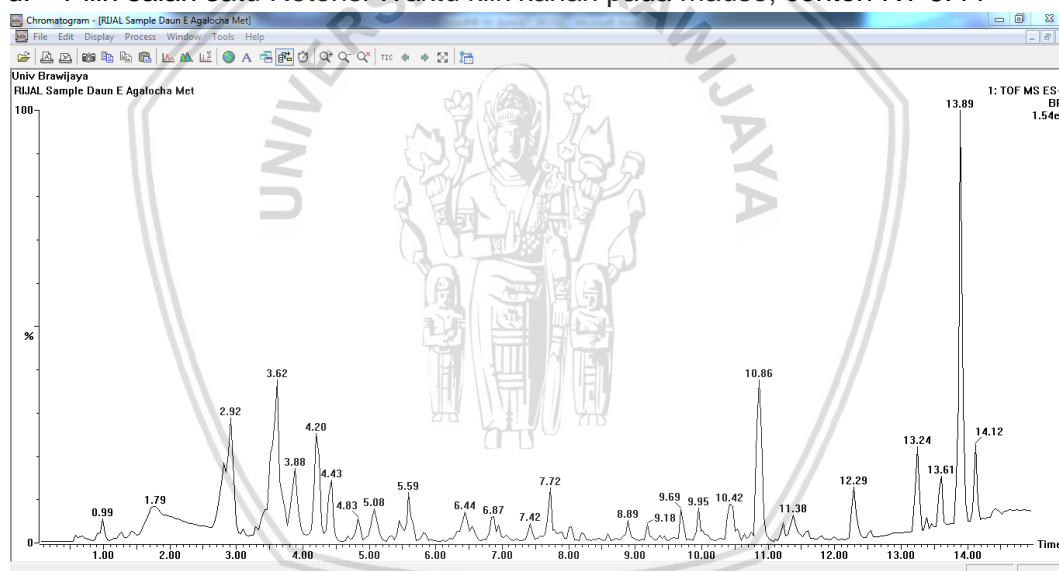
b. Klik Open, lalu buka filenya



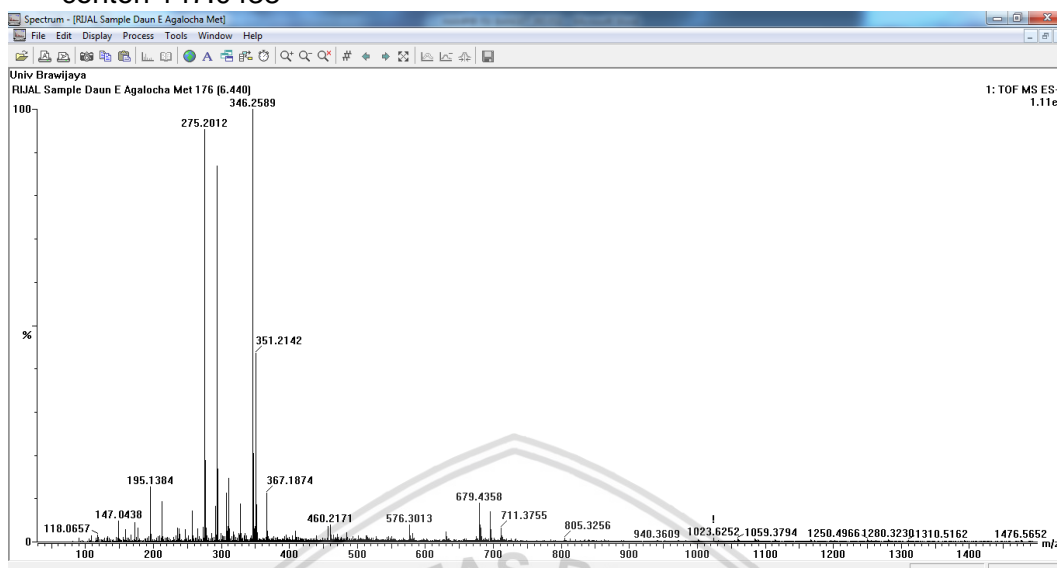
c. Klik Display, lalu Tic, dan centang BPI Chromatogram



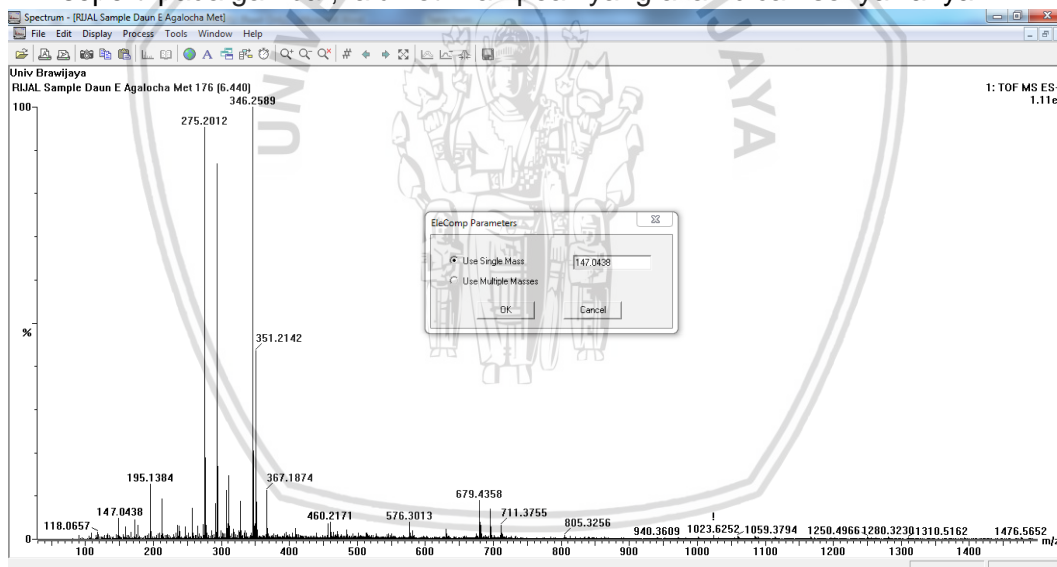
d. Pilih salah satu Retensi Waktu klik kanan pada mause, contoh RT 6.44



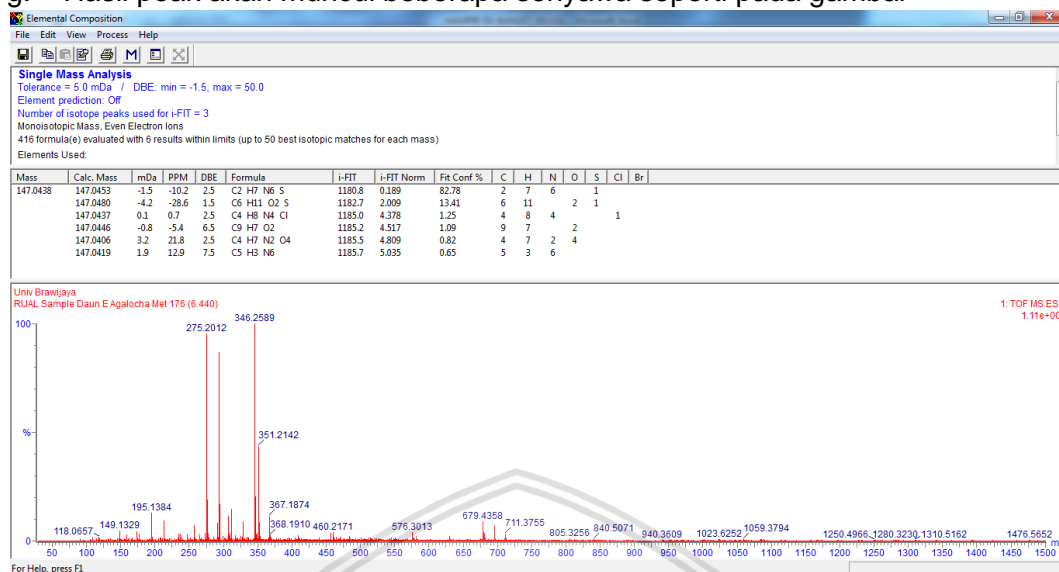
- e. Akan muncul Spectrum pada RT. 6,44. Kemudian pilih salah satu peak, contoh 147.0438



- f. Klik Tools, pilih Elemental Composition, maka akan muncul kotak dialog seperti pada gambar, lalu ketikkan peak yang akan dicari senyawanya



g. Hasil peak akan muncul beberapa senyawa seperti pada gambar



h. Cari senyawa-senyawa yang diduga terdapat pada ekstrak dengan menggunakan website Chemspider. Chemspider dapat dibuka melalui [www.google.com](http://www.google.com)

